



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Cuna de héroes, crisol de pensadores

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DE LA MADERA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA MADERA

**Establecimiento de cultivos *in vitro* y de estacas
para la propagación de *Acer negundo* L.**

TESIS

Que presenta:

BIÓL. LORENA CARRETO MONTOYA

**COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS
Y TECNOLOGÍA DE LA MADERA**

Directores de Tesis:

D.C. JORGE ENRIQUE AMBRIZ PARRA

D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

Morelia, Michoacán, Mayo de 2017



La presente investigación fue realizada en la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera y en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, bajo la dirección de los Dres. Jorge Enrique Ambriz Parra y Rafael Salgado Garciglia.

DEDICATORIA

A mis viejos:

Gloria (†) y Heliodoro (†) por siempre ... Quienes inculcaron en mí valores de responsabilidad y pasión por la vida, aprendí con su amor, enfrentar los momentos más difíciles.

A mis dos grandes amores:

Rodolfo y Aldo Rodolfo mi inspiración y razón fundamental de mi proyecto de vida.

A mis hermanos:

Geraldina, Yuriria y Uriel, por fomentar en mí el deseo de superación, fortaleza y anhelo de triunfo en la vida.

A mis queridos sobrinos:

Helio Uriel, Gloria Alejandra, Ulises Arturo, Yajaziel, Joshua e Hiram Adriél... con todo mi cariño.

SALMO DE LAS MADERAS

*Hay maderas oscuras y profundas
como tus ojos y tus cabellos.*

*Porque tus ojos y tus cabellos son
como maderas profundas y charoladas.*

*Hay maderas suaves y livianas
como tu piel y tu alegría.*

*Porque tu piel y tu alegría son
como maderas suaves y livianas.*

*Hay maderas recias y macizas
como tus piernas y tus espaldas.*

*Porque tus piernas y tus espaldas son
como maderas recias y macizas.*

*Hay maderas húmedas y rojas
como la piel de tus labios y de tu lengua.*

*Porque la piel de tus labios y de tu lengua es
como una madera roja y empapada de savia.*

*Hay maderas olorosas y vivas
como el olor de tu cuerpo.*

*Porque el olor de tu cuerpo es
como el olor de las maderas
cortadas en los tiempos de lluvias.*

*Hay maderas que al ser trabajadas
dan notas musicales y perfectas.*

*Tu amor es una nota musical y perfecta
como el sonido que dan ciertas maderas
cuando son trabajadas.*

*Hay maderas que se quejan en las noches de lluvia
y en las tardes de tormenta.*

*Porque eres triste, y esto te embellece y purifica,
te pareces a esas maderas que se quejan
en las noches de lluvia y en las tardes de tormenta.*

*Hay maderas que tienen un sabor y perfume
tan propios que, cuando se las huele o se las besa,
ya no son olvidadas nunca más en la vida.*

*Porque eres fatalmente inolvidable,
te pareces a esas maderas que se recuerdan
hasta la muerte cuando se las huele o se las besa.*

(Jorge Debravo, 1967)

AGRADECIMIENTOS

A los D.Cs. Jorge Enrique Ambriz Parra y Rafael Salgado Garciglia, por su confianza y su acertada dirección en el presente trabajo de tesis.

A los D.Cs. José Cruz de León, Raúl Espinoza Herrera y Crisanto Velázquez Becerra; integrantes de mi mesa sinodal por sus valiosas aportaciones y sugerencias que contribuyeron a enriquecer esta investigación.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta etapa de mi vida académica.

A cada uno de los profesores de la Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera; POSTECMA, por aportar un sentido crítico a mi formación científica.

Al Centro de Convenciones de Morelia, Michoacán a través del Biólogo Cristóbal Méndez Santiz, por las facilidades otorgadas para la colecta de material biológico de árboles de *Acer negundo*.

Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, por su apoyo y compañerismo, durante el desarrollo experimental en esta investigación.

Al M.C. Luis María Suárez Rodríguez, por su valiosa amistad y apoyo técnico para la presentación de este trabajo.

A la Sra. Estela Méndez, Secretaria de POSTECMA, por su actitud de servicio y apoyo en los trámites administrativos concernientes a la maestría.

A mis compañeros de maestría Ade, Rober, Migue y Lalo quienes me brindaron apoyo y amistad.

CONTENIDO	Página
ÍNDICE DE CUADROS	<i>i</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>iii</i>
RESUMEN	<i>v</i>
ABSTRACT	<i>vii</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
II.1. <i>Acer negundo</i> L.	3
II.1.1. Características botánicas y descripción de la especie	3
II.1.2. Importancia ecológica	4
II.1.3. Usos	5
II.1.4. Propiedades físicas y mecánicas de la madera	6
II.1.5. Factores que afectan la resistencia mecánica de la madera.....	8
II.2. PROPAGACIÓN Y CULTIVO DE <i>Acer negundo</i>	8
II.3. MÉTODOS DE PROPAGACIÓN VEGETATIVA	9
II.3.1. Propagación por estacas.....	10
II.3.2. Propagación <i>in vitro</i> (micropropagación).....	16
II.4. MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES LEÑOSAS	17
II.4.1. Etapas de la micropropagación.....	17
II.4.2. Selección de la planta madre y el tipo de explante	20
II.4.3. Medios y condiciones de cultivo	21
II.4.4. Componentes de medios de cultivo	23
II.4.5. Reguladores de crecimiento vegetal o fitohormonas.....	27
II.4.6. Respuestas de regeneración <i>in vitro</i> (organogénesis y embriogénesis) ...	31
III. JUSTIFICACIÓN	36
IV. HIPÓTESIS	37
V. OBJETIVOS	37

	Pág.
V.1. OBJETIVO GENERAL	37
V.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	38
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	39
VII.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	39
VII.2 MÉTODOS DE ASEPSIA	40
VII.3 MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	42
VII.4 SUPERVIVENCIA Y FORMACIÓN DE BROTES DE <i>Acer negundo</i>	43
VII.5 ENRAIZADO Y BROTEACIÓN DE ESTACAS DE <i>Acer negundo</i>	44
VII.5.1 Sitio 1	44
VII.5.2 Sitio 2.....	45
VIII. RESULTADOS	48
VIII.1. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE ASEPSIA	48
VIII.2. SUPERVIVENCIA Y FORMACIÓN DE BROTES	49
VIII.2.1. Colecta No. 1 Septiembre-Octubre 2015	49
VIII.2.2. Colecta No. 2 Diciembre 2015-Enero 2016	52
VIII.2.3. Colecta No. 3 Marzo-Abril 2016.....	53
VIII.2.3.1. Colecta No. 3. Supervivencia (formación de brotes).....	55
VIII.2.3.2. Colecta No. 3. Porcentaje de brotación	57
VIII.2.4. Colecta No. 4. Junio-Julio 2016. Supervivencia (formación de brotes)....	59
VIII.2.4.1. Colecta No. 4 Junio-Julio. Brotación	61
VIII.3. BROTEACIÓN Y ENRAIZADO DE ESTACAS.....	64
VIII.3.1. Sitio 1. Centro de Convenciones.....	64
VIII.3.2. Sitio 2. Bosque de galería.....	66
IX. DISCUSIÓN.....	69

	Pág.
IX.1. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE ASEPSIA Y TIPO DE EXPLANTE	69
IX.2. SUPERVIVENCIA Y FORMACIÓN DE BROTES	71
IX.3. BROTACIÓN Y ENRAIZADO DE ESTACAS.....	74
X. CONCLUSIONES.....	77
XI. PERSPECTIVAS	78
XII. LITERATURA CITADA	79

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Diferentes usos de <i>Acer negundo</i> y sus productos.	6
Cuadro 2. Comparación de las propiedades físicas y mecánicas de la madera de <i>Acer saccharum</i> (madera dura) y <i>Acer negundo</i> (madera blanda).	7
Cuadro 3. Propagación por estacas para diferentes especies de <i>Acer</i> .	13
Cuadro 4. Composición general para medios de cultivo <i>in vitro</i> .	23
Cuadro 5. Reguladores de crecimiento utilizados en cultivo <i>in vitro</i> de plantas.	28
Cuadro 6. Micropropagación vía organogénesis y proliferación de brotes axilares en doce especies de <i>Acer</i> spp.	33
Cuadro 7. Periodos de colecta de yemas apicales y axilares de <i>Acer negundo</i> .	40
Cuadro 8. Rutinas de asepsia para el establecimiento <i>in vitro</i> de yemas apicales y axilares de <i>Acer negundo</i> .	41
Cuadro 9. Componentes del medio de cultivo MS (pH 5.70) (Murashige y Skoog, 1962).	42
Cuadro 10. Tratamientos con la combinación y concentración de ácido naftalenacético/benciladenina (ANA/BA) (mg/L).	44
Cuadro 11. Tratamientos con Raizone-Plus®, auxina comercial, para la inducción de enraizado y brotación de estacas de <i>Acer negundo</i> .	45
Cuadro 12. Tratamientos con Radix 10,000®, auxina comercial, para la inducción de enraizado y brotación de estacas de <i>Acer negundo</i> .	47
Cuadro 13. Respuesta en porcentajes de contaminación, oxidación, necrosis y supervivencia de yemas apicales de <i>Acer negundo</i> .	48
Cuadro 14. Respuesta en porcentajes de contaminación, oxidación, necrosis y supervivencia de yemas axilares de <i>Acer negundo</i> .	49

	Pág.
Cuadro 15. Porcentajes de supervivencia, de enraizado y número de brotes, en estacas de <i>Acer negundo</i> de Sitio 1.	65
Cuadro 16. Porcentajes de supervivencia, de enraizado y número de brotes y de raíces en estacas de <i>Acer negundo</i> de Sitio 2.	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Explantes de <i>Acer negundo</i> durante el establecimiento <i>in vitro</i> .	50
Figura 2. Colecta No.1. Septiembre-Octubre 2015. Porcentaje de supervivencia (%) en yemas apicales y axilares de <i>Acer negundo</i> cultivadas <i>in vitro</i> .	50
Figura 3. Colecta No. 1. Septiembre-Octubre 2015. Explantes de <i>Acer negundo</i> en cultivo <i>in vitro</i> .	51
Figura 4. Colecta No. 2. Diciembre 2015-Enero 2016. Supervivencia (%) en yemas apicales y axilares de <i>Acer negundo</i> cultivadas <i>in vitro</i> .	52
Figura 5. Colecta No. 2. Diciembre 2015-Enero 2016. Explantes de <i>Acer negundo</i> , a 30 y 60 días de cultivo <i>in vitro</i> .	53
Figura 6. Colecta No. 3. Marzo-Abril 2016. Porcentaje de supervivencia (%) en yemas apicales y axilares de <i>Acer negundo</i> , cultivadas <i>in vitro</i> .	54
Figura 7. Colecta No. 3. Marzo-Abril 2016. Explantes de <i>Acer negundo</i> , a 30 y 60 días de cultivo <i>in vitro</i> .	54
Figura 8. Colecta No. 3 Marzo-Abril 2016. Porcentaje de supervivencia (%) en yemas apicales y axilares de <i>Acer negundo</i> , cultivadas <i>in vitro</i> .	56
Figura 9. Colecta No. 3 Marzo-Abril 2016. Porcentaje de brotación (%) en yemas apicales y axilares de <i>Acer negundo</i> , cultivadas <i>in vitro</i> .	58
Figura 10. Colecta No.3. Marzo-Abril 2016. Brotación de <i>Acer negundo</i> en cultivo <i>in vitro</i> .	59
Figura 11. Colecta No. 4. Junio-Julio 2016. Porcentajes de supervivencia (%) en yemas apicales y axialres de <i>Acer negundo</i> , cultivadas <i>in vitro</i> .	60
Figura 12. Colecta No. 4. Junio-Julio 2016. Explantes de <i>Acer negundo</i> en cultivo <i>in vitro</i> .	62

	Pág.
Figura 13. Colecta No. 4. Junio-Julio 2016. Porcentaje de brotación (%) en yemas apicales y axilares de <i>Acer negundo</i> , cultivadas <i>in vitro</i> .	63
Figura 14. Colecta No. 4. Junio- Julio 2016. Brotes de <i>Acer negundo</i> en cultivo <i>in vitro</i> .	64
Figura 15. Respuesta al enraizado en estacas de <i>Acer negundo</i> colectadas en Sitio 1.	66

RESUMEN

Acer negundo (maple mexicano) es una especie forestal dioica con potencial maderable, catalogada con el estatus de protección especial (Pr) en México, presenta bajo éxito en su propagación por semilla. Como una estrategia para resolver esta problemática, se establecieron cultivos *in vitro* y de estacas para realizar la propagación de este árbol. Cuatro métodos de asepsia se aplicaron para la desinfección superficial de yemas apicales y axilares de esta especie, variando la adición de compuestos antisépticos y el tiempo de exposición a los mismos. Las yemas se obtuvieron de árboles maduros en cuatro épocas del año. Las yemas se cultivaron por 30 días en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) y condiciones de 25°C, 16 h de luz, 2000 lux. Los porcentajes de contaminación, oxidación, necrosis y supervivencia se evaluaron para cada uno de los métodos. Diferentes concentraciones de ácido naftalenacético-benciladenina (ANA-BA) se evaluaron para inducir la formación de brotes en yemas axilares y apicales. Las estacas se cultivaron en turba-agrolita (1:1, v/v) en contenedores en un fitotrón (25°C, fotoperiodo 16 h luz) y fueron tratadas con Raizone-Plus y Radix 10,000. El mejor sistema de asepsia fue con la rutina 4 (aplicación de hipoclorito de sodio, hyclin, Tecto 60, hipoclorito de sodio y Tecto 60). Los mejores resultados de supervivencia (100%) se lograron en yemas axilares. La mejor respuesta a brotación se presentó a los 60 días de cultivo tanto en yemas apicales ($\geq 60\%$) como en yemas axilares ($\geq 70\%$) en el medio MS con concentraciones de BA (0.5 - 2.0 mg/L) y ANA (0.5 - 1.0 mg/L). En general, las estacas enraizaron en un 90% y presentaron la formación de brotes, con hasta 2.3 brotes/estaca, a los 15 días de cultivo. El tipo y posición del explante, el periodo de colecta y la concentración de ANA/BA se establecieron en esta investigación para conseguir el cultivo *in vitro* de *A. negundo*. Así mismo, se logró el enraizado y brotación de estacas de *A. negundo*.

Palabras Clave: *Acer negundo*, yemas apicales, yemas axilares, cultivos *in vitro*, enraizado de estacas.

ABSTRACT

Acer negundo (Mexican maple) is a dioecious forest species with a timber potential, classified with the status of special protection (Pr) in Mexico, with a low success by seed propagation. As a strategy to solve this problem, in this research were established *in vitro* and stake cultures for the propagation of this tree. Four aseptic methods were applied for surface disinfection of apical and axillary buds of this species, varying the addition and time exposition of antiseptic compounds. Buds were obtained from adult trees in four seasons of the year. Buds were cultured for 30 days in the Murashige and Skoog (MS) medium and conditions of 25 °C, 16 h light, 2000 lux. The percentages of contamination, oxidation, necrosis and survival were evaluated for each of the methods. Different concentrations of naphthaleneacetic acid-benzyladenine (NAA-BA) were evaluated to induce the shoot formation in axillary and apical buds. The stakes were cultivated in peat moss-perlite (1:1, v/v) in containers in a phytotron (25 °C, photoperiod 16 h light) and were treated with the Raizone-Plus and Radix 10,000. The best aseptic system was the routine 4 (application of Hyclin, Tecto 60, sodium hypochlorite, sodium hypochlorite and and Tecto 60). The best results of survival (100%) were achieved in axillary buds. The best response was presented to 60 days of culture both in apical buds ($\geq 60\%$) as in axillary buds ($\geq 70\%$), in MS medium with BA concentrations (0.5 - 2.0 mg/L) and ANA (0.5 - 1.0 mg/L). In general, the stakes rooting in 90% and presented the formation of shoots, with up to 2.3 shoots/stake, after 15 days of culture. The type and position of the explant, the collection period and the concentration of NAA/BA were established in this research to get the *in vitro* culture of *A. negundo*. As well, rooting and sprouting of stakes from *A. negundo* were achieved.

Keywords: *Acer negundo*, apical buds, axillary buds, *in vitro* cultures, stakes rooting.

I. INTRODUCCIÓN

La familia Aceraceae está constituida por los géneros *Dipteronia* del centro de China y *Acer*, que se distribuye en Estados Unidos, Canadá, Europa y Este de Asia. El género *Acer* consta de poco más de 110 especies, de las cuales *Acer negundo* L. y *A. negundo* var. *mexicanum* (DC.) Kuntze se reportan en nuestro país. Este último se encuentra en la porción norte de Michoacán y forma parte del bosque de encino, del bosque mesófilo de montaña y del bosque de galería (Calderón de Rzedowski, 2001).

Sin embargo, como sucede en otras especies en el estado de Michoacán, México, *A. negundo* var. *mexicanum* es una especie amenazada con estatus de Protección especial (Pr) según la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) (SEMARNAT, 2010).

A. negundo es una especie forestal dioica, de rápido crecimiento, con potencial maderable para la elaboración de diversos productos. Se utiliza para diversos productos de madera (Alden, 1995; SIRE, 2005; Aguilar-Rodríguez y Castro, 2006), en el área medicinal, ornamental y alimenticio (Vitasse *et al.*, 2009; Wood Handbook, 2010; Way, 2011; Galindo-Bianconi *et al.*, 2012; Omogbadegum, 2013; Łuczaj *et al.*, 2014).

Las investigaciones sobre la conservación y propagación de *Acer negundo* son necesarias, ya que la propagación de maple mexicano es nula por semilla (Hernández, 2011). Dicha problemática obliga a buscar otras estrategias de propagación de *A. negundo*, una alternativa para la propagación de esta especie es la biotecnología vegetal y la propagación por estaca.

Este documento contiene información sobre las diferentes técnicas de propagación vegetal y características generales de *Acer negundo*, en el que se muestran los

resultados de diferentes métodos se asepsia, la selección de explantes, la variación de la supervivencia y de brotación en función de la época de colecta, con el fin de establecer un método para la propagación de *A. negundo*, mediante cultivos *in vitro* y por estacas, utilizando ramas de plantas adultas.

II. MARCO TEÓRICO

II.1. *Acer negundo* L.

A. negundo es una especie de arce originario de las regiones templado-frías, subtropicales y tropicales de América, se extiende desde el Este de Canadá y los Estados Unidos de Norteamérica. Es nativa de estas regiones, sin embargo ha sido exitosamente introducida en Europa, por lo que en varios países son económicamente importantes, ya sea como plantas sacaríferas, ornamentales, forrajeras, medicinales o bien, útiles en la reforestación y la ebanistería (Vitasse *et al.*, 2009; Wood Handbook, 2010; Way, 2011; Galindo-Bianconi *et al.*, 2012; Omogbadegum, 2013; Łuczaj *et al.*, 2014).

En México se distribuye en el norte y centro hasta Guatemala, particularmente su distribución en México se ha reportado en los estados de Nuevo León, San Luis Potosí, Hidalgo, Distrito Federal, Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Michoacán y Jalisco (Calderón de Rzedoswki, 2001).

Para México, esta especie fue clasificada desde 1890 como una subespecie [*Acer negundo* L. subsp. *mexicanum* (DC.) Wesmael], se le conoce como maple mexicano, aunque también es conocido como Zarcillo, Acezintle, Lelé, Zilozóchitl, Amargoso e Icoj (Calderón de Rzedoswki, 2001).

II.1.1. Características botánicas y descripción de la especie

A. negundo pertenece a la Familia Aceraceae, son árboles que alcanzan alturas hasta de 4 a 12 m, con fustes de diámetros hasta de 40 cm; son dioicos, con poca representatividad en Michoacán, principalmente en la región norte en una altitud de 1800-2300 m. Se ha colectado con flor masculina en marzo y abril, con flor femenina y fruto joven en marzo, con fruto maduro en abril y mayo (SIRE, 2005; Ruíz-Jiménez *et al.*, 2012;) con las siguientes características:

Corteza.- Fisurada en placas longitudinales con una coloración pardo rojiza a pardo grisácea en los individuos adultos (Morselli, 1989).

Hojas.- Presenta ramillas pubescentes con hojas trifolioladas, opuestas, imparipinnadas, hasta de 25 cm de largo con todo y pecíolo están compuestas por 3, 5 o 7 folíolos lanceolados, ovados, ovado-lanceolados a ampliamente ovados, de 6 a 15 cm de largo por 3 a 8 cm de ancho, el folíolo terminal más grande. Los folíolos tienen el margen entero, aserrado o aserrado-dentado o lobado; ápice acuminado o caudado y la base oblicua a redondeada. Son verde oscuro y opacas en el haz, con ligera pubescencia y el envés verde grisáceo con pelos glandulares. El pecíolo es rojizo hacia el haz y verde hacia el envés.

Flores.- Son unisexuales, dioicas (femeninas y masculinas) y nacen agrupadas en racimos, carecen de corola.

Frutos.- Nacen en racimos colgantes llamados sámaras que son verdes al principio y conforme maduran, su color adquiere matices púrpura y finalmente se tornan castaño claro, generalmente pubescentes o glabras, de alrededor de 3 cm de largo, con una semilla, raramente 2.

Semillas.- Ovoides o elípticas, lateralmente comprimidas, de unos 7.5 mm de largo por 4.5 mm de ancho, por 1mm de espesor. Su cubierta es verde al principio y luego castaño claro, opaca, lisa y membranosa. Carecen de endospermo y contienen un embrión de color verde, provisto de dos cotiledones plegados, delgados, foliáceos, asimétricos).

II.1.2. Importancia ecológica

Forma parte de los bosques caducifolios, bosques mesófilos y vegetación riparia. Es importante conservar este tipo de bosques, porque ellos tienen alta proporción

de especies amenazadas y/o taxones endémicos. Debido a su restringida distribución y poblaciones compuestas de solo pocos individuos, dichas especies deben ser estudiadas para su conservación. El maple mexicano está en la lista de la *Norma Oficial Mexicana* (NOM-59-SEMARNAT-2010) en la categoría de riesgo con estatus sujeto a Protección Especial (Pr) (SEMARNAT, 2010).

A nivel mundial, se encuentra catalogada con estatus de Vulnerable (VU) en la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y Recursos Naturales (IUCN, por sus siglas en inglés). *The IUCN Red List of Threatened Species™* IUCN 1998:T32480A9703191.

<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1998.RLTS.T32480A9703191>).

Dada la composición dioica de sus individuos, no se tiene conocimiento de cómo están compuestas sus poblaciones y cómo es su estructuración, ya que los árboles empiezan a producir flores desde los tres años de edad en adelante y esto dificulta en cierta medida en etapas tempranas, el reconocimiento de individuos hembras y machos (Méndez, 2004). Esta especie es apropiada para la restauración ecológica, especialmente en ambientes riparios, en las orillas de los arroyos y ríos; tolera contaminación ambiental, sequías y heladas; su presencia proporciona hábitat y alimento a la fauna silvestre (Lamarque *et al.*, 2015).

II.1.3. Usos

El maple mexicano se ha empleado como planta de sombra y ornato en parques y jardines en diferentes partes de México, con frecuencia se planta para formar cortinas rompevientos alrededor de los campos de cultivo, de pastoreo y linderos como cercas vivas (Avendaño y Acosta, 2000). En el Cuadro 1 se describen otros usos de esta especie.

Cuadro 1. Diferentes usos de *Acer negundo* y sus productos.

USOS	PRODUCTO	REFERENCIA
MADERA	Es utilizada como combustible. En la fabricación de cajas para transportar frutos, legumbres y otros tipos de embalaje. Durmientes en las vías del tren. Acabado de interiores Elaboración de pulpa para papel y tableros de aglomerados Muebles rústicos. Elaboración de artesanías y algunos utensilios de cocina.	Alden, 1995; SIRE, 2005; Jiménez <i>et al.</i> , 2006; Wood Handbook, 2010.
DECORATIVO	Como árbol de ornato y para sombra en parques y jardines.	Ortuño, 2006; Rivera <i>et al.</i> , 2008; Galindo-Bianconi <i>et al.</i> , 2012.
ALIMENTICIO	La savia contiene una alta proporción de azúcares y en algunos lugares la utilizan para la elaboración de miel.	Vogt, 1994; Łuczaj <i>et al.</i> , 2014;
MEDICINAL	Existen reportes científicos que partes del árbol como las hojas, tienen compuestos (saponinas) que mostraron tener actividad antitumoral para cáncer de mama. Las semillas como tratamiento para la tos en medicina tradicional	Das Prajapati y Kumar, 2003; Baldi <i>et al.</i> , 2008; Özgen <i>et al.</i> , 2012; Omogbadegun, 2013.
INDICADOR DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL	Como barrera anticontaminante en particular si el contaminante principal es SO ₂	González, 1981

II.1.4. Propiedades físicas y mecánicas de la madera

De las propiedades físicas de la madera, la densidad se considera una de las más importantes, ya que determina el valor, utilidad y trabajabilidad de la madera, y la densidad está fuertemente correlacionada con otras propiedades, como son la resistencia mecánica y la rigidez (Davel *et al.*, 2005). En el Cuadro 2, se comparan algunas de las propiedades físicas y mecánicas de la madera de *Acer saccharum*

(maple azucarero), especie de madera dura y *Acer negundo* (maple mexicano), que es una especie considerada de madera blanda a media.

Cuadro 2. Comparación de las propiedades físicas y mecánicas de la madera de *Acer saccharum* (madera dura) y *Acer negundo* (madera blanda).

Propiedades Físicas	<i>A. saccharum</i>	<i>A. negundo</i>
	Madera dura	Madera blanda-media
Peso verde (kg/m³)	900-1000	700-900
Densidad seca al aire CH 12-15 g/cm³	0.68-0.80	0.50-0.65
Contracción total (normal)		
Radial %	4.8 (~2.8)	3.0-4.8 (~2.0)
Tangencial %	10.0 (~6.0)	7.2-8.2 (~4.0)
Hinchamiento diferencial (%) (%)	radial: 0.17 tangencial: 0.35	radial: 0.13 tangencial: 0.25
Estabilidad dimensional	regular	buen a regular
Propiedades Mecánicas		
Resistencia a la compresión paralela CH 12-15 (N/mm²)	54-59	36-45
Resistencia a la flexión CH 12-15 (N/mm²)	109-121	61-92
Módulo de Elasticidad (flexión) CH 12-15 (N/mm²)	12500-13500	8000-11300
Resistencia al impacto CH 12-15 (kj/m²)	62-70	45-60*
Cizallamiento CH 12-15 (N/mm²)	12-16	10-13
Dureza Janka (lateral) CH 12-15 (KN)	6-7	3-4
Dureza BRINELL (lateral) CH 12-15 (N/mm²)	26-29	17-20

*Valores estimados con base a la densidad seca al aire (CH 12-15 %) (Silva-Guzmán *et al.*, 2011).

II.1.5. Factores que afectan la resistencia mecánica de la madera

Entre los factores que afectan la resistencia mecánica de la madera, se encuentra el daño causado por hongos. En *A. negundo*, el daño se presenta en la albura, por la invasión del hongo *Fusarium negundi*. Dicho hongo, es un hongo cromógeno responsable de la coloración rojiza en la madera de esta especie, (Morse, 2002).

Esta peculiaridad le confiere atractivos estéticos a la madera de *A. negundo*, que pueden ser de alto valor agregado en la elaboración de muebles y/o artesanías, ya que el color de la (albura y duramen) del maple mexicano, sin la presencia del hongo son muy claros (Peters, 2000). Sin embargo, cuando el daño por el ataque de *F. negundi* es severo, éste invade totalmente la albura y presenta lo que se le denomina “duramen patológico” causando devastación total en la madera (Barañao *et al.*, 2008).

II.2. PROPAGACIÓN Y CULTIVO DE *Acer negundo*

Aunque existen escasos reportes de que *A. negundo* se puede propagar tanto por semillas (propagación sexual) como por estacas (propagación asexual); no existen programas establecidos de manejo y conservación para dicha especie por estos métodos de propagación.

Propagación sexual.- Para manejo en vivero de esta especie, la recolección de las semillas se lleva a cabo desde la primavera hasta octubre, se recolectan las semillas verdes (madurez fisiológica) de árboles seleccionados. Una vez en el vivero, las semillas frescas se secan al aire libre y se desalan. Generalmente las semillas son ortodoxas y presentan algún periodo de letargo sembrándose en primavera, pero no se recomienda sembrar en otoño. Se recomienda estratificar las semillas durante tres meses a temperaturas de 4°C, o sembrarlas al momento en que éstas se colectan. También es recomendable remojar las semillas dos semanas antes de la siembra (SIRE, 2005). No obstante, éste parece ser un mecanismo poco exitoso;

ya que en un estudio realizado por Hernández-Cuevas (2011), no se observó la germinación de las semillas de *A. negundo*.

Propagación asexual.- Puede realizarse por partes vegetativas como esquejes o estacas o bien, por propagación *in vitro* (micropropagación), aunque no se han reportado protocolos exitosos con estos dos métodos.

Debido a que *A. negundo* presenta entrenudos largos, se recomienda usar estacas menores a 20 cm de longitud. Si no se cuenta con plantas donantes jóvenes, se sugiere revertir este material a su condición de juveniles mediante podas severas, ya que se ha observado que se tiene más éxito utilizar los chupones o vástagos originados como consecuencia de las heridas de poda en la parte inferior del tronco (SIRE, 2005). En la propagación por estacas de *A. negundo*, la información disponible para esta especie es muy limitada (Dirr y Heuser Jr., 2006).

Sólo hay reportes para otras especies de *Acer*: Medinilla (2011) llevó a cabo el establecimiento, propagación y conservación *in vitro* de porciones de nudo y tallo de *A. skutchii*, logrando solamente el desarrollo de callo, presentándose además, alta contaminación en los explantes por hongos y bacterias; Rovinã *et al.* (2010), probaron la capacidad de regeneración *in vitro* de *A. platanoides* "Globosum" y *A. negundo* "Variegatum", consiguiendo para ésta última sólo el desarrollo de callo; Brassard *et al.*, 2003; lograron el enraizado de brotes de *A. saccharum* por multiplicación de yemas *in vitro*.

II.3. MÉTODOS DE PROPAGACIÓN VEGETATIVA

La propagación vegetativa, asexual o clonación se define como la reproducción de una planta a partir de una célula, un tejido, un órgano (raíces, tallos, ramas, hojas). En teoría cualquier parte de una planta puede dar origen a otra de iguales características y considerando las condiciones de crecimiento (luz, temperatura, nutrientes, etc.). Esto se debe a que muchas de las células de los tejidos vegetales

ya maduros, conservan la potencialidad de multiplicarse, diferenciarse, y dar origen a diversas estructuras como tallos y raíces; estos grupos celulares forman parte de meristemos primarios y secundarios que pueden encontrarse en todos los órganos de las plantas (Rojas *et al.*, 2004).

Según Vásquez *et al.* 1997 (citado por Rojas *et al.*, 2004), la propagación vegetativa tiene tres variantes, que son: la micropropagación a partir de tejidos vegetales en cultivos *in vitro*, la propagación por partes vegetativas como rizomas, estacas, bulbos, tubérculos, estolones y segmentos de órganos como tallos y hojas (esquejes), que conserven la capacidad de enraizar y; la propagación por injertos de segmentos de la planta sobre tallos de plantas receptoras más resistentes.

La propagación vegetativa representa una forma más directa para mantener características genéticas de una planta madre o élite.

II.3.1. Propagación por estacas

La propagación por estacas consiste en cortar brotes, ramas o raíces de plantas, las cuales se colocan en una cama de enraizado, con el fin de lograr la emisión de raíces y brotación de la parte aérea, hasta obtener una nueva planta (Rojas *et al.*, 2004).

La propagación por estacas es un método económico, rápido y no exige técnicas especiales comparado con otras formas de propagación, con el que se han propagado plantas herbáceas, arbustivas y leñosas como frutales y forestales (Núñez-Sosa, 2007).

No todas las partes vegetativas de la planta leñosa sirven para estacas, las de fácil enraizado se obtienen de madera dura y las de difícil enraizado de madera tierna. Se define como madera dura, aquellas ramas de uno o más años de edad y madera

tierna, las ramas menores de un año, que aún se encuentran en proceso de crecimiento y en plena actividad fisiológica (Rojas *et al.*, 2004).

Cuando se trate de madera dura, se deben de obtener de aquellas ramas más maduras que correspondan a zonas basales de las mismas, debido a que la garantía de su prendimiento es mayor. La emisión de raíces en plantas que no tienen esta facultad o que el brote de raíces es deficiente, se puede inducir con el uso de productos con reguladores de crecimiento o fitohormonas (Hartman y Kester, 1985; Rojas *et al.*, 2004).

Las auxinas son reguladores del crecimiento vegetal, y en dosis muy bajas regulan algunos procesos fisiológicos de las plantas. Las funciones de éstas son la promoción del enraizado, mediante la división y crecimiento celular, la obtención de nutrientes y de otras sustancias al sitio de aplicación, además de las relaciones hídricas y fotosintéticas de las estacas, entre otras. En la mayoría de las especies forestales, en las que se ha utilizado la auxina ácido indol-3-butírico (AIB), para el enraizado de estacas, se han obtenido resultados satisfactorios. Los métodos ampliamente conocidos en la aplicación de AIB, son en forma de soluciones acuosas por medio del remojo de la base de las estacas (de 2 a 3 cm) o bien el fitorregulador como polvo o talco, que se aplica de acuerdo a las instrucciones de las formulaciones comerciales (Hartman y Kester, 1985; Dirr y Heuser Jr., 2006).

Los factores que tienen mayor influencia para lograr un adecuado enraizado en la propagación por estacas son: el manejo de la planta madre con el fin de obtener brotes juveniles; un buen estado nutricional; colecta en la época y edad apropiada; la longitud y diámetro de las estacas; la presencia de hojas y yemas; tratamientos con los reguladores de crecimiento; tipos de sustratos; y las condiciones ambientales como la iluminación, la temperatura, la humedad relativa. Además, es importante la capacidad de la estaca ya enraizada, para prosperar después del trasplante y conseguir plantas de calidad (Gárate, 2010).

Las estacas de muchas especies enraízan con facilidad en una gran diversidad de medios, pero aquellos que lo hacen con dificultad, puede tener gran influencia el tipo de medio de enraíce que se utilice, no solo en el porcentaje de estacas enraizadas sino también en la calidad del sistema radical formado (Medina, 2015).

Después de haber preparado las estacas y antes de aplicarles el medio de enraizado, es necesario tratarlas con fungicidas, ya que frecuentemente se logra la supervivencia de la estaca y una mejor calidad de las raíces (Weaver, 1990, citado por Gárate, 2010).

Los estudios para la propagación de estacas se ha realizado con la aplicación exógena de auxinas, favoreciendo la formación de raíces en diversas especies forestales como: *Alnus acuminata*, *Cinnamomum* sp., *Cupressus lusitanica*, *Dalbergia congestiflora*, *Eucalyptus globus*, *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus* spp, *Gmelina arborea*, *Hieronyma alchorneoides*, *Malus* spp, *Nothofagus alpina*, *Podocarpus glomeratus*, *Tectona grandis*, *Terminalia amazonia*, *Tilia mexicana*, *Ulmus mexicana* y *Vochysia guatemalensis* (Badilla y Murillo, 2005; Gutierrez, 2005; Morales 2006; Muñoz *et al.*, 2011; Rueda, 2013; Hernández, 2014; Ayma y Soto, 2015).

Las especies de *Acer* propagadas en forma vegetativa por estacas destacan: *A. grandidentatum*, *A. rubrum*, *A. saccharinum*, *A. saccharum* y *A. xfreemanii*, las cuales fueron tratadas con AIB (Smalley y Dirr, 1987; Preece *et al.*, 1991; Wilkins *et al.*, 1995; Tousignant, *et al.*, 2003; Reed, 2010).

Dirr y Heuser Jr. (2006), realizaron un estudio, donde se describe el enraizado de estacas para más de treinta especies del género *Acer*. Sin embargo, en esta investigación, los mismos autores no reportan resultados de enraizado para *A. negundo*; afirmando que hay información limitada al respecto (Cuadro 3).

Cuadro 3. Propagación por estacas para diferentes especies de *Acer*.

ESPECIE	ENRAIZADOR	DOSIS	PLANTA MADRE	TAMAÑO ESTACA	ENRAIZADO (%)
<i>A. buergerianum</i>	AIB (polvo)	20000 ppm o 25% de cloromona	árbol maduro fines junio	3 a 4 nudos retirar punta	60 36
<i>A. campestre</i>	AIB (polvo)	8000 ppm	árbol maduro principio Junio	--	75 2-4 semanas
<i>A. capillipes</i>	AIB (polvo)	10000ppm	árbol de 40 años mediado Agosto	--	92 9 semanas
<i>A. carpinifolium</i>	AIB (polvo)	8000 ppm 0.8 %	árbol maduro fines Junio	3 a 4 nudos retirar punta	90 6 semanas
<i>A. circinatum</i>	--	--	--	--	Dificultad para enraizar
<i>A. cissifolium</i>	AIB (polvo)	10000ppm	Agosto árbol de 35 años	--	100
<i>A. davidii</i>	--	--	--	--	Dificultad para enraizar
<i>A. griseum</i>	--	--	--	--	Extremadamente difícil para enraizar
<i>A. henryi</i>	AIB (polvo)	20000ppm 2%	árbol de 4 a 5 años fines de Junio	--	100
<i>A. japonicum</i>	AIB (polvo)	8000ppm	mitad de Junio	--	66 a100 6 a 7 semanas
<i>A. mandshuricum</i>	--	--	--	--	Muy difícil para enraizar
<i>A. maximowiczianum</i> (<i>A. nikoense</i>)	--	--	--	--	Extremadamente difícil para enraizar

Cuadro 3. Propagación por estacas para diferentes especies de *Acer* (Continuación).

<i>A. miyabei</i>	Cloromona AIB (polvo) +tiram	8000ppm	mitad de Mayo finales de Julio	-- tallos basales	44 14 semanas 60 9 semanas
<i>A. negundo</i>	AIB (polvo)	8000ppm	Mitad de Septiembre	estacas de "Aureo- variegatum"	Sorprendentemente información limitada disponible
<i>A. palmatum</i>	AIB (polvo) o solución	1 a 2 %	principios Febrero y Marzo	tallos suaves	0 a 100
<i>A. pensylvanicum</i>	--	--	--	--	fracaso en el enraizado
<i>A. platanoides</i>	AIB (polvo)	8000ppm	Mitad de Junio	3" de longitud 2 nudos	85
<i>A. pseudoplatanus</i>	--	--	--	--	dificultad para enraizar
<i>A. pseudosieboldianum</i>	AIB (polvo)	2%	Finales de Junio	4 a 8" de longitud	61
<i>A. rubrum</i>	AIB/ ANA	1000 ppm 500 ppm solución	Junio y Julio	9" de long. de 2 a 4 nudos	exitosa en 3 semanas
<i>A. rufinerve</i>	--	--	--	--	No existen reportes para enraizado por estacas
<i>A. saccharinum</i>	catecol estimula iniciación AIB	1.0%	Noviembre	9" de longitud	84

Cuadro 3. Propagación por estacas para diferentes especies de *Acer* (Continuación).

<i>A. saccharum</i>	AIB solución	5000 ppm	mediados de Junio	estacas juveniles	65 a 89
<i>A. saccharum</i> subsp. <i>nigrum</i>	AIB (polvo) + 3.8 % benlate	8000 ppm	inicio Junio	--	60
			inicio Julio		56
			mitad Julio		52
<i>A. sieboldianum</i>	AIB (polvo) + thiram	8000ppm	fines de Julio	estacas de árbol maduro	dificultad para enraizar
<i>A. spicatum</i>	AIB (polvo)	2%	Julio	estacas de 4 a 8"	25 no exitoso en el invierno
<i>A. tataricum</i>	AIB (polvo)	8000ppm	mitad Agosto	--	56 en 8 semanas
<i>A. tataricum</i> subsp. <i>ginnala</i>	AIB solución	1000 a 5000ppm	Junio	estacas de madera suave	90 Declinamiento del enraizado en tejidos maduros
<i>A. triflorum</i>	AIB (polvo) Cloromona solución	2% 25%	finales de Junio	estacas de 4 a 8" de longitud	58 17
<i>A. truncatum</i>	--	--	--	--	no existen reportes
<i>A. truncatum</i> subsp. mono	--	--	--	--	dificultad al enraizado
<i>A. truncatum</i> subsp. <i>mayrii</i> **	--	--	--	--	Dificultad al enraizado Aparentemente especie resistente a insectos y a enfermedades; razones suficientes para extender su uso.

--: Indica que no hay información.

II.3.2. Propagación *in vitro* (micropropagación)

La propagación *in vitro* o también denominada micropropagación, consiste en la propagación de un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas de cultivos de tejidos, la cual constituye un potencial sistema de propagación comercial (Briones, 2015).

La micropropagación constituye una alternativa de reproducción asexual, la cual se realiza tomando una pequeña parte de tejido vegetal o “explante” (tallos, hojas, flores, raíces etc.), de la planta donadora libre de patógenos exógenos y es cultivado en un medio nutritivo en recipientes estériles. La variación en la composición del medio (fuente de carbono y nitrógeno, sales inorgánicas, reguladores de crecimiento, vitaminas, aminoácidos, entre otros) y las condiciones de cultivo (temperatura, intensidad de luz y fotoperiodo, humedad y otros), son factores que influyen en el desarrollo de tejido o explante y puede ser dirigido a través de diferentes vías hasta que finalmente una planta intacta sea regenerada. Toda la progenie proviene de una sola planta, a esta progenie se le denomina clones (Loyola-Vargas y Vázquez-Flota, 2006).

La propagación *in vitro*, es una tecnología ampliamente conocida y manejada por más de cinco décadas en México y muchos países del mundo. En la actualidad, se conoce que este tipo de tecnología se aplica con diversos propósitos: conservación de germoplasma, obtención de plantas libres de patógenos, obtención de metabolitos secundarios, estudios fisiológicos diversos, propagación masiva de plantas, especialmente para especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción (Segretín, 2006). En la actualidad, la micropropagación es el método biotecnológico más competitivo para la producción masiva de plantas de interés económico (Salgado-Garciglia, 2013).

II.4. MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES LEÑOSAS

Actualmente se encuentra en la literatura información numerosa relacionada con micropropagación de tejidos vegetales, sin embargo, en plantas leñosas endémicas o bien aquellas que presentan alguna categoría de riesgo de extinción, la información es muy escasa o nula. Por consiguiente es fundamental que se realicen estudios dirigidos a especies con alguna de estas características.

Las plantas leñosas son más difíciles de propagar que las plantas herbáceas. Los métodos que actualmente se siguen para la propagación de éstas son por esquejes, estacas e injertos, pero estos métodos son menos exitosos. Esto es debido a la rápida pérdida de la capacidad de enraizamiento, con respecto a la edad de la planta y el número limitado de propágulos que pueden ser obtenidos en un tiempo razonable (Sharma y Vashistha, 2015).

Los métodos convencionales de propagación de plantas leñosas, tienen potencial limitado para su producción a gran escala. Sin embargo, debido a la importancia de estas especies en el ámbito forestal, comercial, medicinal y aquellas que se encuentran con algún estatus de amenaza; es necesario desarrollar métodos de propagación confiables y rápidos. Una alternativa, en este sentido, la ofrece la propagación de plantas a través de la biotecnología de cultivo de tejidos vegetales (Sharma y Vashistha, 2015).

II.4.1. Etapas de la micropropagación

En los protocolos utilizados durante el cultivo *in vitro*, se pueden distinguir etapas o fases bien definidas, cada una con sus objetivos específicos.

a) Fase 0: Selección y preparación de la planta madre/donante

La selección del tipo de explante para la multiplicación de brotes está basada en que la planta presenta yemas vegetativas preformadas, las cuales al cultivarse

responderán con un desarrollo de yemas adventicias, incrementando el número de brotes. El estado fisiológico de la planta madre al tiempo del corte de los explantes definitivamente influirá en la respuesta de las yemas (Segretín, 2006; Salgado-Garciglia, 2013; Briones, 2015).

b) Fase 1: Establecimiento *in vitro*

El éxito de los sistemas de propagación *in vitro* depende en gran medida del control y prevención de la contaminación microbiana. Hoy en día la contaminación es uno de los principales y más severos problemas para los micropropagadores de plantas en el mundo; de ahí la importancia que representa un eficiente protocolo de asepsia. En esta etapa se realiza el corte y la desinfección de los explantes; generalmente se les aplica un método de asepsia que consiste en colocarlos en diferentes soluciones antisépticas como etanol e hipoclorito de sodio comercial y algunas veces se suplementan con antibióticos o fungicidas (Segretín, 2006; Salgado-Garciglia, 2013; Briones, 2015).

c) Fase 2: Multiplicación de brotes

En esta etapa, los explantes brotan masivamente, al estar cultivados en medio nutritivo con fitohormonas, como auxinas y citocininas. El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento). Los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento, y las condiciones de crecimiento en esta etapa; juegan un papel crítico sobre la multiplicación de los explantes (Segretín, 2006; Salgado-Garciglia, 2013; Briones, 2015).

d) Fase 3: Inducción de raíces

En la fase de enraizamiento, es recomendable utilizar brotes de alrededor de un centímetro de longitud y medios de cultivo suplementados con auxinas. De las auxinas, la más utilizada es el ácido 3-indolbutírico (AIB). En las especies herbáceas es relativamente fácil el enraizamiento; mientras que en las leñosas es complicado

por su limitada capacidad rizogénica. Para esta etapa es esencial, establecer un medio de cultivo inductor de raíces en los brotes con la finalidad de convertir a éstos en plántulas completas con un óptimo desarrollo (Segretín, 2006; Salgado-Garciglia, 2013; Briones, 2015).

e) Fase 4: Trasplante y aclimatación

Esta etapa abarca el trasplante de las plántulas del medio aséptico de cultivo al medio natural. El proceso denominado aclimatación es necesario para que las plantas puedan desarrollar raíces y brotes funcionales debido a un retorno gradual a las características normales, aumentando así su resistencia a la desecación y al ataque de microorganismos patógenos. En esta fase, las plántulas micropropagadas son cultivadas en condiciones *ex vitro*, sembrándolas en un sustrato ideal según el tipo de planta (mayormente se utiliza una mezcla 1:1 de turba y agrolita), en condiciones de alta humedad. De forma paulatina, las plantas se adaptan al ambiente, permitiendo la disminución de la alta humedad y que se desarrollen nuevas raíces y hojas (Segretín, 2006; Salgado-Garciglia, 2013; Briones, 2015).

f) Fase 5: Cultivo en invernadero

Las plantas son cultivadas en forma individual (macetas) y son mantenidas bajo cultivo en invernadero para su crecimiento y desarrollo óptimo, después del periodo de adaptación. El uso de los invernaderos tradicionales, a veces no son la mejor opción. En esta fase existen variables importantes de las cuales depende el éxito del trasplante. Entre ellas están el sustrato, humedad relativa, temperatura, intensidad luminosa y fertilización (Segretín, 2006; Salgado-Garciglia, 2013; Briones, 2015).

II.4.2. Selección de la planta madre y el tipo de explante

a) Selección de la planta madre

La iniciación de todo proceso de cultivo de tejidos sólo tiene sentido cuando se emplea un material de partida adecuado. La constitución genética de la planta donante es el primer factor a evaluar. Para la mayoría de las plantas propagadas *in vitro*, el material inicial es una planta élite seleccionada por características fenotípicas especiales (Adema, 2015).

b) Estado fisiológico de la planta

El estado fisiológico de la planta donante, es de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo, reportándose diferencias en los requerimientos nutricionales y hormonales cuando los tejidos provienen de plantas con diferente edad fisiológica. Generalmente, se utilizan plantas en estado de crecimiento activo, vigoroso y sano (Adema, 2015).

c) Tipo del explante y posición en la planta

El explante es una parte del tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta para ser cultivado en condiciones *in vitro*, sobre un medio de cultivo. Los explantes pueden provenir de raíces, hojas, meristemas vegetativos o reproductivos (Jácome, 2011).

Los explantes más utilizados para iniciar la propagación clonal *in vitro* de una planta son las yemas apicales del tallo, estacas uninodales portando yemas axilares, discos de hoja, secciones de raíz y meristemas. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* puede iniciarse a partir de diferentes órganos o tejidos, siendo de gran importancia en la posterior respuesta del explante; su tamaño, tipo y época de colecta (Adema, 2015).

Se ha observado que la edad fisiológica de los explantes tiene gran influencia en la morfogénesis. Se sabe que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a cultivar, mejor será la respuesta *in vitro* (Jácome, 2011).

Los materiales que han demostrado tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, sean yemas axilares o apicales de tallos o de embriones cigóticos (Adema, 2015).

Otro factor que determina la capacidad regenerativa de los explantes, es la estacionalidad, ya que se ha observado que la respuesta diferencial de los cultivos *in vitro* a la contaminación es más alta en otoño e invierno (Adema, 2015).

El tamaño del explante, es un factor importante que influye en la regeneración de plantas, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, mientras que a mayor tamaño del explante, son mayores las probabilidades de contaminación y más rápido el crecimiento y la regeneración directa de órganos (Adema, 2015).

El crecimiento de plántulas *in vitro* no solo depende de la naturaleza de los explantes, sino también de la posición de los nudos, como lo indica el estudio realizado en la especie forestal *Nauclea diderrichii* (Pitekélabou, 2015). En éste, se señala que la mejor respuesta se obtuvo en los brotes inducidos por segmentos nodales apicales, ya que mostraron una mejor respuesta en elongación y enraizado comparado con la respuesta de los segmentos nodales medios y basales.

II.4.3. Medios y condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo en las cuales crecen los explantes, son el resultado de la interacción de tres factores: el estado del explante o tejido vegetal, determinado en parte por el medio de cultivo, el recipiente de cultivo y el ambiente externo o condiciones de crecimiento del cuarto de cultivo (Olmos *et al.*, 2010).

La propagación de plantas bajo condiciones *in vitro*, están expuestas a condiciones de crecimiento únicas como: luz baja, alta humedad e intercambio gaseoso pobre; dichas condiciones pueden contribuir a un rápido crecimiento y multiplicación de los explantes (Sharma y Vashistha, 2015).

El papel de la luz en la diferenciación involucra varios componentes como son la intensidad, su calidad, y el fotoperiodo. En lo que concierne a la temperatura de incubación, en explantes de especies leñosas, fluctúa entre 24 y 28°C (Villalobos, 1983).

La composición del medio de cultivo garantiza que se le suministren los nutrientes al tejido vegetal *in vitro* y debe ser muy parecido a las condiciones nutricionales que ofrece el suelo a las plantas en su estado natural. Los componentes principales del medio son: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes gelificantes y hormonas o reguladores de crecimiento vegetal (Perea y Tirado, 2011, citado en Boeri, 2015).

No existe un medio universal para todos los propósitos ni para todas las especies que se trabajan *in vitro*, sin embargo se puede utilizar el medio básico Murashige y Skoog, 1962 (MS); para la mayoría de los estudios de cultivos *in vitro*, con 3% de sacarosa (w/v) y 0.8% de agar (w/v) (Boeri, 2015; Sharma y Vashistha, 2015).

Entre los medios nutritivos, para el cultivo y propagación *in vitro* de especies leñosas, los más comunes son: Medio para plantas leñosas (WPM), Schenk e Hildebrandt (SHM), medio de White (WM) y medio de Branton y Blake (B&BM) (Sharma y Vashistha, 2015). Otros medios conocidos son: Linsmaier y Skoog (LS) (1965); Borgin y Nitsch (BN) (1967); Gamborg (B5) (1970); y el de Miller y Oyima (1968) citados en (Ramos, 2012).

El pH es necesario ajustarlo en los medios de cultivo, con el fin de lograr una correcta gelificación del medio y también incide en la capacidad de absorción de sales minerales. En general el pH no debe ser inferior a 5.8 (Boeri, 2015).

II.4.4. Componentes de medios de cultivo

En el Cuadro 4 se mencionan los componentes fundamentales en la composición de los medios nutritivos para los cultivos *in vitro*.

Cuadro 4. Composición general para medios de cultivo *in vitro*.

Agua	
Compuestos orgánicos	Suplementos macroorgánicos: Carbohidratos
	Suplementos microorgánicos: Vitaminas Aminoácidos Reguladores de crecimiento: auxinas, citocininas, giberelinas, brasinoesteroides y etileno Antibióticos
Compuestos inorgánicos	Macronutrientes Micronutrientes
Compuestos indefinidos	Agua de coco Extractos de levadura Caseína hidrolizada Agentes solidificantes Carbón activado

a) Agua

Suele utilizarse agua destilada. En ocasiones específicas puede utilizarse agua corriente, pero debe evitarse porque la presencia de ciertos cationes (como Ca^{2+} o Mg^{2+}) puede formar sales insolubles con otros componentes del medio (como los fosfatos) sobre todo, durante el proceso de esterilización (Boeri, 2015).

b) Compuestos orgánicos

Suplementos macroorgánicos.- Carbohidratos: Se pueden utilizar sustancias puras o mezclas de sustancias orgánicas. Como sustancias puras más comunes se encuentran los azúcares, frecuentemente son utilizados como fuente de carbono y energía. La sacarosa y la glucosa se utilizan en el cultivo de tejidos de muchas especies, la mejor fuente de carbohidratos (2-5%) y la más utilizada en cultivos *in vitro* de plantas es la sacarosa. El uso de la dextrina, pectina y almidón se han reportado en la organogénesis indirecta de *Sequoia* (Boeri, 2015). El manitol es un azúcar alcohol que puede ser agregado al medio de cultivo como aporte nutritivo o para regular el control osmótico del sistema.

Suplementos microorgánicos.- Incluye compuestos orgánicos que benefician el crecimiento y morfogénesis del material vegetal. Entre ellos están las vitaminas, aminoácidos, complejos naturales de composición química indefinida y reguladores de crecimiento (Boeri, 2015). Vitaminas: Los complejos vitamínicos contienen elementos esenciales para las plantas. Aunque las vitaminas normalmente son sintetizadas por ellas, son también requeridas para su crecimiento y diferenciación. Cuando las células de plantas superiores son cultivadas *in vitro*, la ausencia de vitaminas constituye un factor limitante del crecimiento (Boeri, 2015). No obstante, estas necesidades dependen de la especie considerada. Las vitaminas que son adicionadas más usualmente en medios de cultivo son: Tiamina (conocida como vitamina B1), que es necesaria para que las células puedan realizar sus funciones vitales, durante el ciclo vital normal de las plantas verdes y se utiliza en concentraciones cercanas a 0.4 mg/L; Riboflavina (vitamina B2), que forma parte de las vitaminas del complejo B, ayuda en la metabolización de carbohidratos y en la respiración celular, es termoestable y fotosensible; Ácido nicotínico (niacina o vitamina B3), que estimula el crecimiento de las plantas a través de su participación como componente de co-enzimas que actúan en las reacciones de energía, es foto- y termo-estable, por lo general se agrega al medio entre 0.1 a 10 mg/L; Adenina (vitamina B4), es parte integral de los ácidos nucleicos y actúa débilmente como citocinina, se utiliza como sulfato de adenina para promover la formación de brotes;

Ácido pantoténico (vitamina B5), es termoestable, por lo que puede ser esterilizado junto con el medio nutritivo, éste no es una vitamina esencial; Piridoxina (vitamina B6), es termo- y foto-estable, aunque no es considerada esencial en el cultivo de tejidos, participa en la síntesis de purinas y pirimidinas y por lo tanto, en el metabolismo de los ácidos nucleicos, estimula el crecimiento vegetal interviniendo en las reacciones de energía; Ácido ascórbico (vitamina C), que interviene en los sistemas de oxidación de la célula y establece potenciales favorables de óxido-reducción, por lo que utiliza como antioxidante para prevenir la oxidación de compuestos fenólicos; Tocoferol (vitamina E), mejora y promueve la dispersión de cultivos en suspensión; Biotina (vitamina H), no es esencial pero es utilizada en el metabolismo de grasas, proteínas y carbohidratos; Ácido fólico (vitamina Bc o M), no es esencial y se descompone con el calor en soluciones ácidas, en la oscuridad inhibe el crecimiento de los tejidos, mientras que en la luz lo promueve; Inositol o myo-inositol, es un azúcar alcohol que está incluido dentro del complejo de la vitamina B, se agrega en casi todos los medios de cultivo a razón de 100 mg/L y como suplemento de la sacarosa (Boeri, 2015); Aminoácidos, éstos representan una fuente efectiva e inmediata de nitrógeno para las células, el más utilizados en medios de cultivo es la glicina, aportan un balance adecuado de la relación NH_4/NO_3 que es usualmente suministrado como NO_3^- , NH_4 , NO_3 , NH_4Cl , etc. Su papel en la nutrición de los tejidos y células vegetales es complejo, ya que la respuesta de los tejidos dependerá del suplemento adicionado (Ramos, 2012).

c) Compuestos inorgánicos

Son las sales minerales necesarias para el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales, sus funciones en un medio de cultivo pueden ser específicamente en el metabolismo (como las sales de K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , etc.) (Boeri, 2015).

Macronutrientes: Son elementos esenciales que la planta los requiere en cantidades del orden de gramos/litro (C, H, N, O, S, Mg, Ca, K, P). Quizá los requerimientos minerales más obvios son los de fósforo (necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos), de azufre (aminoácidos, cisteína y metionina) o nitrógeno

(el segundo elemento tras el carbono entre los que forman la célula). Aunque se pueden utilizar fuentes orgánicas, es común usar como fuente de fósforo un fosfato, la de azufre como un sulfato y la de nitrógeno como nitrato o una sal de amonio (Boeri, 2015).

Micronutrientes: Son los nutrientes necesarios en pequeñas cantidades, elementos que la planta requiere en cantidades del orden de mg/litro (Fe, Mo, Ni, Cu, Zn, Mn, B). Son esenciales para el funcionamiento de varias enzimas y deben estar incluidos en el medio de cultivo (Boeri, 2015).

d) Compuestos indefinidos

Son aquellos compuestos que se adicionan al medio de cultivo cuando los requerimientos nutricionales son complejos o se pretende un crecimiento rápido, se utilizan mezclas de sustancias orgánicas llamados también, compuestos indefinidos. Los más comunes en la preparación de los medios de cultivo, son el agua de coco, caseína hidrolizada y el extracto de levadura, que constituyen una fuente orgánica de nitrógeno (Boeri, 2015): Agua de coco, es un medio bastante complejo que contiene un rango amplio de compuestos orgánicos e inorgánicos; El extracto de levadura es una fuente natural de vitaminas; Caseína hidrolizada, es una mezcla indefinida de proteínas que se utiliza en cultivo de tejidos como una fuente indefinida de nitrógeno orgánico;

e) Agentes solidificantes

Mayormente se utiliza el agar-agar y el agar nutritivo o bacteriológico. Se añaden para preparar medios de cultivo sólidos y semisólidos. La concentración de agar en los medios de cultivo sólidos es variable y depende de la calidad, pero usualmente es de 0.7-1.5%.

f) Carbón activado

Debido a que algunas plantas se caracterizan por liberar pigmentos oscuros después de un corte, determinados como compuestos fenólicos y taninos que se

oxidan y posteriormente dificultan el crecimiento y desarrollo del cultivo *in vitro*, es necesario adicionar al medio de cultivo antioxidantes. El carbón activado es un compuesto antioxidante que contribuye a absorber esos compuestos fenólicos. Se adiciona en concentraciones cercanas al 0.1 - 3% (w/v).

II.4.5. Reguladores de crecimiento vegetal o fitohormonas

Los reguladores de crecimiento vegetal, son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones internas, cercanas a 1 mM (milimolar: 0.001 moles por litro de solución). Estos compuestos, se producen en pequeñas cantidades en tejidos vegetales, y pueden actuar en el propio tejido donde se generan o bien a largas distancias, mediante transporte a través de los vasos del xilema y floema. Los reguladores de crecimiento vegetal, controlan un gran número de procesos, entre ellos el crecimiento de las plantas, la caída de las hojas, la floración, la formación del fruto y la germinación (Salisbury y Ross, 1994).

La adición de estas fitohormonas, al medio de cultivo, en diferentes proporciones puede estimular o detener el crecimiento o diferenciación de algunos órganos de la planta. La respuesta de los reguladores de crecimiento, no sólo está determinada por el tipo de tejido vegetal (explante), sino que dichas respuestas dependen también de la especie, del órgano del vegetal, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones entre reguladores de crecimiento y diversos factores ambientales (Rojas, 2004).

La utilización de éstos, en diferentes concentraciones y la mezcla de varios, se pueden manipular algunos procesos morfogénicos de la planta. Los principales reguladores de crecimiento son: auxinas, citocininas, giberelinas (GA3), brasinoesteroides como inductores de crecimiento; ácido abscísico (ABA) y etileno como inhibidores del crecimiento (Rojas, 2004). En el Cuadro 5 se mencionan los reguladores de crecimiento más utilizados en el cultivo *in vitro* de plantas.

Cuadro 5. Reguladores de crecimiento utilizados en cultivo *in vitro* de plantas.

Regulador	Abreviatura	Nombre Químico
Auxinas	AIA	Ác. 3-indolacético
	ANA	Ác. Naftalenacético
	AIB	Ác. Indolbutírico
	ApCFA	Ác. (4-clorofenoxi) acético
	2,4-D	Ác. 2,4-diclorofenoxiacético
	Picloram	Ác. 4-amino-3,5,6-tricloropico-línico
	ANOA	Ác. naftoxiacético
Citocininas	KIN	Kinetina (6-furfurilaminopurina)
	BAP o BA	6-benzilaminopurina o 6-benziladenina
	2Ip	Isopentiladenina
	ZEA	Zeatina ((6-benzilamino)-9-2-tetrahidropiranyl-9H-purina))
	PBA	N-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil) aminopurina
TDZ	Tidiazurón (1-fenil-3(1,2,3-tidiazol-5il)urea))	
Giberelinas	GA3	Ac. Giberélico (2,4a,7-trihidroxi-1-metil-8-metil-gibene-1,10-ácido carboxílico-1,4-lactona
Inhibidores	ABA	Ácido abscísico
Etileno	C2H4	Etileno
	Ethephon, Ethrel	Ácido 2-cloroetilfosfónico

a) Auxinas

Las auxinas son el grupo más conocido de fitorreguladores, que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular, su principal actividad es la elongación celular y sobre la formación de raíces. Se trasportan polarmente, a través del floema, desde los ápices (caulinares y radicales). Promueven el desarrollo de raíces laterales y adventicias e intervienen en el tropismo a la gravedad y a la luz, la dominancia apical, el crecimiento de las partes florales, y la diferenciación de los tejidos vasculares (Jácome, 2011; Ramos, 2012; Boeri, 2015).

Los tipos de auxinas más utilizadas son el ácido indol-3- acético (AIA), el ácido indol butírico (AIB), el ácido α -naftalenacético (ANA), el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y

el Picloram. El AIA es la única auxina natural que se localiza en las zonas de crecimiento, migra por el floema al resto de la planta en forma basipétala (de arriba para abajo). Es fotosensible, por lo que no es conveniente utilizarlo en cultivo en suspensión. Por ser hormona natural, su desaparición del tejido es muy rápido (Jácome, 2011).

El AIB, el ANA y el 2,4-D son auxinas sintéticas esenciales para el cultivo de meristemos, en los procesos de morfogénesis directa e indirecta, en la inducción de embriogénesis somática, en el enraizamiento de microesquejes y actúan promoviendo el crecimiento de ápices caulinares. El Picloram es un herbicida sistémico de acción hormonal, penetra por las hojas y partes verdes jóvenes (yemas), se moviliza por toda la planta en forma acropétala (de abajo hacia arriba) y basipétala (Ramos, 2012; Boeri, 2015).

b) Citocininas

Las citocininas es un grupo importante de los reguladores de crecimiento vegetal, tienen la propiedad de promover el crecimiento y desarrollo, y ayudan a retardar la senescencia, actúan con las auxinas para controlar el crecimiento y el desarrollo. Su principal actividad es división celular e inducir la generación de brotes (Quinapallo y Velez, 2013). Entre las citocininas naturales se encuentran: Zeatina (ZEA), isopentil-adenina, dimetil amino purina, dihidroxizeatina y metilzeatina. La Kinetina (KIN) y el 6-bencilaminopurina (BAP o BA) son sintéticas. El BA se utiliza actualmente tal vez más que la KIN o la ZEA (Jácome, 2011).

Son producidas en las zonas de crecimiento, como los meristemos, en la punta de las raíces (zonas próximas del ápice) y son transportadas vía acropétala, moviéndose a través de la savia en los vasos correspondientes al xilema desde el ápice de la raíz hasta el tallo o brote, estimulando la división celular en tejidos no meristemáticos. Las citocininas paradójicamente, son inhibidoras de la rizogénesis a fuertes dosis, sin embargo, su presencia es positiva porque actúan en interacción con las auxinas sobre la desdiferenciación y división celular. Es importante realizar

un justo equilibrio auxinas/citocininas. Este equilibrio existe naturalmente en la mayor parte de las plantas. Es igualmente importante su efecto de romper la latencia en yemas axilares (Rojas, 2004).

c) Giberelinas

Se encuentran naturalmente en las plantas y existen varios tipos, siendo las más comunes: GA1, GA3, GA4, GA7, GA9. El GA3 corresponde al ácido giberélico. Las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en las puntas de las raíces y en semillas en desarrollo. Su principal función es incrementar la tasa de división celular (mitosis) estimulando la división y elongación celular e interrumpen el período de latencia de las semillas (Rojas, 2004).

d) Ácido abscísico

Es un inhibidor natural del crecimiento celular y la fotosíntesis, por lo tanto tiene efectos contrarios a los de los reguladores de crecimiento (auxinas, giberelinas y citocininas). El ácido abscísico (ABA), se encuentra en todas las partes de la planta, principalmente en la base del ovario, semillas y frutos jóvenes y su síntesis ocurre en las yemas. Este ácido ha sido propuesto como un regulador en respuestas fisiológicas tan diversas como el letargo, abscisión de hojas y frutos y estrés hídrico. Entre las funciones de este inhibidor, se conoce que promueve la latencia en yemas y semillas, inhibe la división celular, causa el cierre de los estomas, anula el efecto de las giberelinas, e inhibe el crecimiento (Rojas, 2004).

e) Etileno

Es un gas, hidrocarburo no saturado muy diferente a otras fitohormonas. Está implicado en procesos de maduración, abscisión, senescencia, dormancia, floración y otras respuestas. Sus principales funciones son promover la maduración de los frutos, la senescencia (envejecimiento), la caída de las hojas y el geotropismo en las raíces (Rojas, 2004).

f) Brasinoesteroides

Los brasinoesteroides son compuestos naturales que se encuentran en pequeñísimas cantidades en los órganos de las plantas, preferentemente en los tejidos y órganos más jóvenes. Entre sus efectos fisiológicos se pueden mencionar que influye o dirige procesos de movilización dentro de las plantas, en cultivo de tejidos, en presencia de auxinas y citocininas, estimula el crecimiento de callos induciendo el alargamiento y la división celular, y promueve la elongación de tejidos vegetales (Jácome, 2011).

II.4.6. Respuestas de regeneración *in vitro* (organogénesis y embriogénesis)

Se denomina morfogénesis a los cambios morfológicos que ocurren, como resultado de cambios estructurales y/o de organización durante el desarrollo de un organismo. En este sentido, la totipotencialidad de las células vegetales permite inducir la formación de estructuras y órganos *de novo*. Por lo tanto, la morfogénesis *in vitro* consiste en la obtención de órganos o embriones a partir de un explante (Villarreal, 2015). La regeneración de plantas por cultivo de tejidos vegetales, se puede realizar por la multiplicación de brotes preformados (yemas axilares, apicales) o induciendo estructuras adventicias. Existen dos rutas morfogénicas implicadas en la diferenciación de *de novo* de brotes y/o plantas completas, que dependiendo del tipo de explante puede seguir las siguientes rutas:

a) Organogénesis directa

Consiste en la generación de brotes directamente del explante, esta ruta generalmente se sigue cuando se utilizan meristemas vegetales ya sea de yemas apicales o axilares. Las yemas axilares de varias especies de plantas leñosas se han utilizado para la micropropagación por esta ruta como: *Tinospora cordifolia*, *Ficus religiosa* y *Morinda citrifolia* entre otras. En el caso de yemas apicales, la propagación *in vitro* vía organogénesis directa se ha logrado en la especie *Chimonanthus praecox*, arbusto conocido como calicanto del Japón y *Cinnamomum*

camphora (alcanfor), árbol ornamental y medicinal (Rojas, 2004; Sharma y Vashistha, 2015).

b) Organogénesis indirecta

El explante genera la formación de una masa indiferenciada de células llamada callo. Para la inducción de callo son cultivados diferentes explantes en medios nutritivos suplementados con diferentes concentraciones de auxinas de manera individual o en combinación con citocininas. La regeneración de brotes a partir de callo, se ha obtenido en plantas leñosas como: *Helicteris isora*, *Moringa oleífera*, *Gmelina arbórea*, entre otras (Rojas, 2004; Sharma y Vashistha, 2015).

c) Embriogénesis somática directa

Existen dos tipos de embriogénesis somática: directa e indirecta. Es un proceso de morfogénesis que implica la formación de un embrión a partir de una o un grupo de células, sin la necesidad de la fusión de gametos (Zimmerman, 1993). La embriogénesis somática directa, es la formación de embriones somáticos directamente en los explantes. En *Azadirachta indica* conocido como el árbol de neem, se ha logrado la generación de embriones somáticos por esta vía (Sharma y Vashistha, 2015; Villareal, 2015).

d) Embriogénesis somática indirecta

La embriogénesis somática indirecta, es la formación de embriones somáticos a partir de callos denominados embriogénicos, previamente desarrollados a partir de diversos explantes vegetales (Pérez-Molphe *et al.*, 1999 citado por Villareal, 2015). La multiplicación por esta vía se ha logrado en *Hemidesmus indicus* conocida como zarzaparrilla indú (Sharma y Vashistha, 2015).

En el Cuadro 6 se describe la micropropagación vía organogénesis para doce especies de *Acer*, donde se considera el tipo de explante, edad de los árboles donadores, medio para multiplicación y enraizamiento, supervivencia en la aclimatación y pruebas de campo (Đurkovič y Mišalová, 2008).

Cuadro 6. Micropropagación vía organogénesis y proliferación de brotes axilares en doce especies de *Acer*.

Especies	Tipo de explante	Edad de los árboles donadores	Medio para multiplicación	Medio para enraizamiento	Aclimatación (%) supervivencia	Pruebas de campo
<i>A. caudatifolium</i>	Yemas axilares	Plántulas de dos años	WPM 0.7 mg L ⁻¹ BAP + 0.05 mg L ⁻¹ NAA	½ WPM 1.0 mg L ⁻¹ IBA	80%	NR
<i>A. x freemanii</i> 'Marmo'	Puntas de los brotes; segmentos nodales	Árboles rejuvenecidos de cuatro años	LS 1.0 µM BAP + 0.01 µM TDZ	LS medio libre de reguladores de crecimiento	85%	NR
<i>A. grandidentatum</i>	Segmentos nodales	Plántulas de dos años	DKW 27.37 µM zeatina	DKW medio libre de reguladores de crecimiento	100%	NR
<i>A. palmatum</i> 'Osakii'	Puntas de brotes; segmentos nodales	Árboles de cuatro años	WPM 0.01 mg L ⁻¹ TDZ	WPM 1.0 mg L ⁻¹ IBA	95%	NR
<i>A. platanoides</i>	Yemas axilares	Plántulas de dos años; árboles de diez años	WPM 0.5 mg L ⁻¹ KIN; WPM 0.1 µM TDZ	½ WPM 1.0 mg L ⁻¹ IBA	Exitoso	PD

Cuadro 6. Micropropagación vía organogénesis y proliferación de brotes axilares en doce especies de *Acer*. (Continuación).

<i>A. platanoides</i> 'Crimson King'	Puntas de brotes	Árboles maduros injertados en portainjertos	LS 1.0 μM BAP + 0.005 μM TDZ	$\frac{1}{2}$ LS 5.0 μM IBA + $\frac{1}{2}$ LS M libre de reguladores de crecimiento	Exitoso	NR
<i>A. pseudoplatanus</i>	Embriones zigóticos; brotes de tocón; micro estacas	Plántulas germinadas; árboles de 60 a 100 años	MS 1.0 μM BAP + 0.04 μM TDZ	MS 123.0 μM IBA + MS libre de reguladores de crecimiento	Exitoso	NR
			MS 0.1 mg L^{-1} KIN; MS libre de reguladores de crecimiento	MS 0.1 mg L^{-1} KIN; MS libre de reguladores de crecimiento	Exitoso	NR
<i>A. rubrum</i>	Yemas axilares	Árboles de 20 a 40 años	MS 0.1 mg L^{-1} BAP + 0.01 mg L^{-1} TDZ	$\frac{1}{3}$ WPM 0.1 mg L^{-1} IBA; MS libre de reguladores de crecimiento	77%	Después de cinco EC
<i>A. rubrum</i> 'Red Sunset'	Segmentos nodales	No reportado	MS 0.01 mg L^{-1} TDZ	WPM 1.0 mg L^{-1} IBA; MS 1.0 mg L^{-1} IBA	95%	NR
<i>A. saccharinum</i>	Puntas de brotes; segmentos nodales	Plántulas juveniles; árboles maduros rejuvenecidos	DKW 0.01 μM TDZ	Enraizador libre de reguladores de crecimiento <i>ex vitro</i> ; 1.0 mM IBA bajo enraizado <i>ex vitro</i>	90%	PD

Cuadro 6. Micropropagación vía organogénesis y proliferación de brotes axilares en doce especies de *Acer*. (Continuación).

<i>A. saccharinum</i> 'Pyramidale'	Puntas de brotes	Árboles maduros	LS 1.0 μ M BAP +0.005 μ M TDZ	½ LS 5.0 μ M IBA + ½ LS libre de reguladores de crecimiento	Exitoso	NR
<i>A. saccharum</i>	Yemas axilares	Plántulas de dos años	MS 2.0 mg L ⁻¹ 2iPA + 0.01 mg L ⁻¹ TDZ	MS 0.3 mg L ⁻¹ PAA + 0.5 mg L ⁻¹ IBA	No reportado	NR

Abreviaciones: 2,4-D, 2,4-ácido diclorofenoxiacético; 2iPA, 6-(γ - γ -dimetilamino) purina ribósido; 4-CPPU, N-(2-cloro-4-pyridyl)-N'-fenilurea; BAP, 6 benciladenina; DKW, Medio de Driver y Kuniyuki "walnut"; PD, Plantación de Demostración; GA3, ácido giberélico; EC, Estaciones de Crecimiento; HM, Medio de Heller; IBA, ácido indol-3butírico; KIN, kinetina; LS, Medio de Linsmaier y Skoog; MS, Medio de Murashige y Skoog; NaA, Ácido1-naftalenacético; NR, No Reportado; PAA, ácido fenilacético; M-L RG, Medio Libre de Reguladores de Crecimiento; RM, Medio de Rugini; SH, Medio de Schenk y Hildebrandt; TDZ, Tiazurón; WPM, Medio para plantas leñosas.

III. JUSTIFICACIÓN

Acer negundo L. “maple mexicano” es una especie forestal de rápido crecimiento incluida en la *Norma Oficial Mexicana* (NOM-059-SEMARNAT-2010) con estatus de protección especial (Pr). Esto es debido posiblemente a sus escasas poblaciones de individuos. La madera de *A. negundo* representa potencial comercial en la manufactura de muebles rústicos y artesanías.

A. negundo presenta un problema grave de reproducción. Bajos o nulos porcentajes de germinación se han reportado. Por lo que la propagación asexual o vegetativa ofrece una estrategia de multiplicación a partir del establecimiento de métodos de propagación *in vitro* y por estacas.

La aplicación de estas tecnologías permitirá desarrollar programas de propagación y cultivo de *A. negundo*, para su manejo en plantaciones forestales y de su conservación.

IV. HIPÓTESIS

La propagación de *Acer negundo* se obtendrá con el establecimiento de cultivos *in vitro* y de estacas.

V. OBJETIVOS

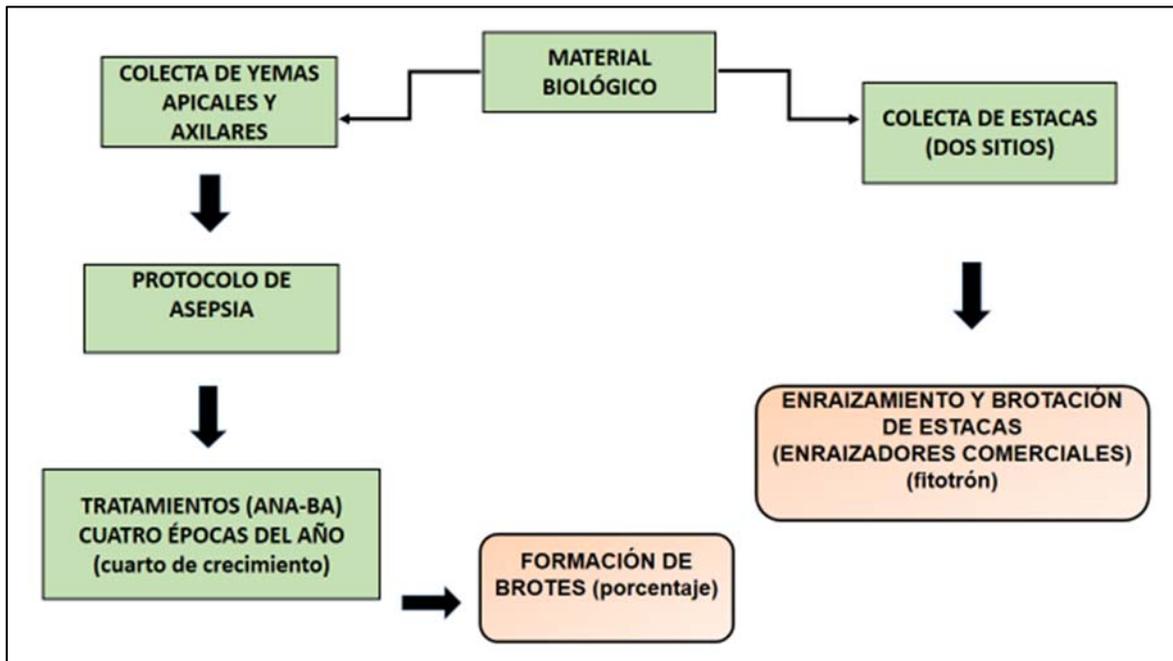
V.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer el sistema de propagación *in vitro* y por estacas de *Acer negundo*.

V.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar el tipo de explante para un óptimo establecimiento *in vitro* de *A. negundo*.
- 2) Determinar el método de asepsia para establecer los cultivos *in vitro* de yemas apicales y axilares de *A. negundo*.
- 3) Evaluar diferentes concentraciones de auxina-citocinina (ácido naftalenacético- benciladenina), para inducir la formación de brotes en yemas apicales y axilares de *A. negundo*.
- 4) Evaluar el efecto de enraizadores comerciales sobre el enraizado y brotación de estacas de *A. negundo*, en condiciones controladas de cultivo.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1. MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico de *Acer negundo* consistió de yemas apicales y axilares (explantes) y de estacas.

Los explantes se obtuvieron de ramas de árboles adultos machos del Centro de Convenciones de Morelia, Michoacán en cuatro épocas del años (otoño-invierno 2015 y primavera-verano 2016), que fueron utilizados para el establecimiento y la inducción de la formación de brotes *in vitro*.

Las estacas se obtuvieron de árboles machos de dos sitios y se utilizaron para inducir el enraizamiento y la brotación. Los sitios fueron: Sitio 1, Centro de Convenciones Morelia, Michoacán, México, con una ubicación de Latitud 19° 41' 0"N y Longitud -101° -10' -52"; Sitio 2, Bosque de galería Carretera-Planta de Luz, localidad de Tirio, Municipio de Morelia, Michoacán, México, con una Latitud de 19° 32' 56" N y una Longitud de -101°-15'-4" W.

Cuatro colectas de material biológico se realizaron en el sitio 1. Los árboles seleccionados tuvieron una altura de 5 m y 1.5 m de fuste limpio. La colecta de ramas se realizó a partir de la primera rama hasta los siguientes 40 cm hacia la parte superior del árbol (copa). Las colectas se realizaron en dos posiciones opuestas entre sí de la copa del árbol (Este y Oeste). Las ramas se cortaron con garrocha y tijeras de jardinería a una longitud de 70 cm, diámetro de 0.5-1.5 cm y con 9 a 11 nudos por rama.

Las ramas colectadas se transportaron en bolsas de polietileno con papel periódico húmedo para evitar la deshidratación de las yemas axilares y apicales.

La obtención de las yemas se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). El número y periodo de colecta de ramas se describen en el (Cuadro 7).

Cuadro 7. Número y periodos de colecta de ramas de *Acer negundo*.

Número de colecta	Periodo de colecta
1	Septiembre-octubre 2015 (Otoño)
2	Diciembre 2015-enero 2016 (Invierno)
3	Marzo-abril 2016 (Primavera)
4	Junio-julio 2016 (Verano)

VII.2 MÉTODOS DE ASEPSIA

Cuatro métodos de asepsia se probaron en las yemas apicales y axilares de *A. negundo* solo en la primera colecta (otoño) (Brassard, 2003; Rovinã *et al.*, 2010; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011; Hernández, 2014). En estos protocolos (rutinas) de asepsia, los compuestos antisépticos fueron variados en concentración y tiempo de exposición (Cuadro 8).

El método de desinfección superficial con mejores resultados se aplicó en las yemas de la segunda, tercera y cuarta colecta. Las yemas apicales y axilares fueron de 1.5 cm de longitud para todas las colectas.

Cuadro 8. Rutinas de asepsia para el establecimiento *in vitro* de yemas apicales y axilares de *Acer negundo*.

Rutina de Asepsia	Solución desinfectante	Concentración (%)	Tiempo de exposición (min)
Rutina 1	-Hipoclorito de sodio comercial (6% cloro activo)	10	30
	-Tween 20	0.05	30
	-Benlate (benomilo, compuesto activo)	10	1
	-Tecto 60 (tiabendazol, compuesto activo)	30	1
	-Hipoclorito de sodio comercial (6% cloro activo)	10	1
	-Agua destilada estéril (tres lavados)		
Rutina 2	-Hyclin® + Tecto 60 (5.0 g/L) + Agrimicín (bactericida) 5.0 g/L	15	15
	-Hipoclorito de sodio comercial (6% cloro activo) + Tecto 60 (5.0 g/L)	20	20
	-Agua destilada estéril (tres lavados)		
Rutina 3	-Etanol	70	2
	-Hipoclorito de sodio comercial (6% cloro activo)	20	20
	-Agua destilada estéril (tres lavados)		
Rutina 4	-Hipoclorito de sodio comercial (6% cloro activo)	20	10
	-Hyclin® + Tecto 60 (5.0 g/L)	10	10
	-Hipoclorito de sodio comercial (6% cloro activo) + Tecto 60 (5.0 g/L)	20	20

VII.3 MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Los frascos de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 15 lb/in² durante 25 min y se utilizaron para colocar 20 mL del medio de cultivo y los explantes. La siembra de las yemas apicales y axilares se realizó en campana de flujo laminar. Una yema por frasco se colocó sobre el medio de cultivo. El medio nutritivo Murashige y Skoog, 1962 (MS), fue adicionado con 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar y 0.05 mg/L de benciladenina (BA) a un pH de 5.70 (Cuadro 9). Los reactivos constituyentes del medio MS fueron marca J.T. Baker® y Sigma®.

El cuarto de cultivo tuvo un fotoperiodo de 16 horas luz, con una intensidad de 2000 luxes (132 $\mu\text{E m/seg}^2$) y una temperatura de 25°C.

Cuadro 9. Componentes del medio de cultivo MS (pH 5.70)

Componente	mg/L
(NH₄) NO₃	1650
KNO₃	1900
Ca Cl₂ 2 H₂O	440
Mg SO₄ 7 H₂O	370
Fe SO₄ 7 H₂O	27.8
Na₂ EDTA	37.3
Mn SO₄ 4H₂O	22.3
Zn SO₄ H₂O	8.6
H₃BO₃	6.2
KI	0.83
Na₂ MoO₄ 2 H₂O	0.25
Cu SO₄ 5 H₂O	0.025
Co Cl₂ 6 H₂O	0.025
Myo-Inositol	100
Ac. Nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	0.1
Glicina	2.0
Sacarosa	30 000
Agar Bacteriológico	8000

Los parámetros evaluados fueron: porcentaje de contaminación, porcentaje de oxidación, porcentaje de necrosis y porcentaje de supervivencia (n=5). La evaluación se hizo cada 7 días y hasta los 30 días. Estos parámetros se utilizaron: para evaluar la eficacia de los métodos de asepsia en las yemas de la primera colecta y para evaluar la eficacia del método elegido en las yemas del resto de las colectas.

Una vez establecido el sistema de asepsia, el establecimiento *in vitro* tanto de yemas apicales como de yemas axilares se realizó en el medio MS solidificado con 8 g/L de agar bacteriológico (Bioxón®), adicionado con 0.05 mg/L de (BA). Los explantes se cultivaron durante 90 días, evaluando porcentaje de supervivencia y desarrollo de brote inicial.

VII.4 SUPERVIVENCIA Y FORMACIÓN DE BROTES DE *Acer negundo*

Las yemas apicales y axilares, que mostraron un buen desarrollo de brote inicial, fueron cultivadas en medios de cultivo MS con diferentes concentraciones de la auxina ácido naftalenacético (ANA) y la citocinina benciladenina (BA). Las concentraciones fueron: 0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/L de ANA y 0, 0.05, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/L de BA. Se utilizaron para promover la formación de brotes (Cuadro 10). Las concentraciones de referencia fueron de 0.3-1.0 mg/L de BA y de 0.01-0.08 mg/L de ANA, ya que éstas fueron utilizadas en *Acer skutchii* para la multiplicación de brotes (Medinilla, 2006).

Los porcentajes de supervivencia y de formación de brotes fueron evaluados a los 30 y 60 días de cultivo en yemas apicales y axilares. Los tratamientos tuvieron 7 repeticiones (n=7).

Cuadro 10. Tratamientos con la combinación y concentración de ácido naftalenacético/benciladenina (ANA/BA) (mg/L) para la inducción y multiplicación de brotes en yemas apicales y axilares de *Acer negundo*.

TRATAMIENTO	Ácido naftalenacético (ANA mg/L)	Benciladenina (BA mg/L)
T0	0	0
T1	0	0.05
T2	0.1	0.5
T3	0.5	0.5
T4	0.1	1
T5	0.5	1
T6	1	2

VII.5 ENRAIZADO Y BROTACIÓN DE ESTACAS DE *Acer negundo*

VII.5.1 Sitio 1

En Julio de 2016, las ramas se colectaron de un individuo macho adulto de ≈ 5 m de altura de *A. negundo* y fueron utilizadas como fuente de estacas para su enraizado y brotación. Presentaron corteza lisa y de color claro. Las estacas fueron de 20 cm cada una, conteniendo de 2 a 3 nudos. Presentaron de una a dos yemas de 0.5 a 1.0 cm de diámetro. Estacas con tres diámetros se obtuvieron de las ramas. Los diámetros fueron 0.5, 1.0 y 1.5 cm de la parte apical, media y basal de la rama, respectivamente (Muñoz-Flores *et al.*, 2011). La parte basal fue la más cercana al fuste.

Las estacas fueron cultivadas en contenedores de 5 L. Los contenedores fueron llenados con una mezcla 1:1:1 turba-agrolita-tierra de hoja (v/v) como sustrato. En éstos, las estacas fueron cultivadas en condiciones de fitotrón, bajo condiciones controladas de fotoperiodo de 16 horas luz y temperatura de 22°C.

A las estacas, previo a la siembra, se les aplicó el enraizador comercial Raizone-Plus® (600 ppm de AIB), tanto en solución como en polvo, utilizando los siguientes tratamientos:

Sin enraizador-sin fungicida (tratamiento 0)

Raizone-Plus® en solución + fungicida (tratamiento 1)

Raizone-Plus® en polvo* + fungicida (tratamiento 2)

El enraizador en solución se preparó disolviendo 20g en 50 mL de agua corriente. Las estacas se colocaron en esta solución por 6 horas. El fungicida Tecto 60® (5g/L) se adicionó para evitar la contaminación por hongos. El tratamiento en polvo con Raizone-Plus® consistió en sumergir la base de cada estaca en la solución con fungicida y después ponerlas en contacto con el enraizador (Cuadro 11).

Cuadro 11. Tratamientos con Raizone-Plus®, auxina comercial, (600 ppm de AIB), para la inducción de enraizado y brotación de estacas de *Acer negundo*.

TRATAMIENTO	RAIZONE PLUS® Auxina enraizadora ácido indolbutírico (AIB)	TECTO 60® fungicida 5g/L
T0	--	--
T1	10 ppm	√
T2	Polvo	√

Los tratamientos consistieron de 10 repeticiones (n=10). Las estacas se cultivaron por 30 días, evaluando el porcentaje de supervivencia, porcentaje de enraizado y número de brotes a los 15 y 30 días.

VII.5.2 Sitio 2

En Marzo de 2016, estacas de un árbol macho (10 m de altura) de *A. negundo* fueron utilizadas para su enraizado y brotación. Las estacas tuvieron 20 cm de

longitud y presentaron un color verde claro, corteza lisa y de 2 a 3 nudos. Presentaron de una a dos yemas de 0.5 a 1.0 cm de diámetro. Sus diámetros fueron de 1.0 y 1.5 cm de la parte media y basal de la rama respectivamente (Muñoz-Flores *et al.*, 2011). La parte basal fue la más cercana al fuste.

Las estacas se cultivaron en contenedores de PVC (rizotrones). Los rizotrones se llenaron con una mezcla 1:1 de turba-agrolita (v/v) como sustrato. Las estacas se cultivaron en fitotrón bajo condiciones controladas de fotoperiodo de 16 horas luz y temperatura de 22 °C. Éstas, previo a la siembra, fueron tratadas con el enraizador comercial, Radix 10,000® (10,000 ppm de AIB), aplicando los diferentes tratamientos:

- T0 Control absoluto (sin enraizador y sin fungicida)
- T1 Control positivo (sin enraizador + fungicida)
- T2 Enraizador comercial Radix 10,000® (1 ppm + fungicida)
- T3 Enraizador comercial Radix 10,000® (5 ppm + fungicida)
- T4 Enraizador comercial Radix 10,000® (10 ppm + fungicida)

La solución de Radix 10,000 se preparó en base a la concentración de AIB del contenido del enraizador. La aplicación del enraizador fue mediante inmersión directa por 6 horas en cada una de las estacas en una solución acuosa (medio y basal). La auxina comercial se adicionó con el fungicida Tecto 60® (5g/L), para evitar la contaminación por hongos en todos los tratamientos (Figura 7).

Los tratamientos se describen en el Cuadro 12 que consistieron de cinco repeticiones (n=5). Cinco estacas por tratamiento se cultivaron por 45 días. Las variables evaluadas fueron el porcentaje de supervivencia, porcentaje de enraizado, número de brotes y número de raíces a los 15, 30 y 45 días.

Cuadro 12. Tratamientos con Radix 10,000®, enraizador comercial con ácido indolbutírico (AIB), para la inducción de enraizado y brotación de estacas de *Acer negundo*.

TRATAMIENTO	RADIX 10,000® Auxina enraizadora ácido indolbutírico (AIB)	TECTO 60® fungicida 5g/L
T0	--	--
T1	--	√
T2	1 ppm	√
T3	5 ppm	√
T4	10 ppm	√

VIII. RESULTADOS

VIII. 1. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE ASEPSIA

La rutina 4 fue el método de asepsia más efectivo para establecer los cultivos *in vitro* de los explantes de *Acer negundo* L. Con ésta. Se presentó el porcentaje más alto de supervivencia y el más bajo porcentaje de contaminación, oxidación y/o necrosis, tanto en yemas apicales como axilares. Los porcentajes de supervivencia se obtuvieron de alrededor de 60 y 80% en yemas apicales. Porcentajes iguales o menores al 40% se presentaron en los explantes sometidos a las demás rutinas. (Cuadro 13). Los explantes de yemas axilares presentaron un 80 y 100% de supervivencia con la rutina 4 (Cuadro 14). También cabe señalar, que una variación en los resultados fue observada con respecto al tipo de yema, es decir, las yemas apicales mostraron mayores porcentajes de contaminación, oxidación, necrosis y menor porcentaje de supervivencia con respecto a los porcentajes de las yemas axilares.

Cuadro 13. Respuesta de contaminación, oxidación, necrosis y supervivencia de yemas apicales de *Acer negundo*, de dos posiciones opuestas entre sí, durante la fase de establecimiento *in vitro* a los 30 días de cultivo.

Rutina	Posición	Contaminación (%)	Oxidación (%)	Necrosis (%)	Supervivencia (%)
1	1	40	20	20	40
	2	80	0	20	0
2	1	60	20	0	40
	2	60	20	20	20
3	1	100	0	0	0
	2	80	0	20	0
4	1	0	0	20	80
	2	20	60	20	60

Cuadro 14. Respuesta de contaminación, oxidación, necrosis y supervivencia de yemas axilares de *Acer negundo*, de dos posiciones durante la fase de establecimiento *in vitro* a los 30 días de cultivo.

Rutina	Posición	Contaminación (%)	Oxidación (%)	Necrosis (%)	Supervivencia (%)
1	1	40	20	0	60
	2	60	20	20	20
2	1	60	20	0	40
	2	40	20	40	20
3	1	60	0	40	0
	2	80	0	20	0
4	1	0	0	0	100
	2	0	20	20	80

La contaminación en los explantes fue siempre por hongos y fue detectada a los 8 días de cultivo en las yemas apicales (Figura 1A) y a los 15 días de cultivo para las axilares. La aparición de oxidación y/o necrosis fue detectada mayormente a los 8 días de cultivo para ambos tipos de yemas (Figura 1B). Los explantes libres de contaminación, oxidación y necrosis de las yemas apicales (Figura 1C) y axilares (Figura 1D) fueron utilizados para la siguiente etapa de inducción y formación de brotes en yemas apicales y axilares de *A. negundo*.

VIII. 2. SUPERVIVENCIA Y FORMACIÓN DE BROTES

VIII. 2.1. Colecta No. 1 Septiembre-Octubre 2015

Porcentajes bajos de supervivencia se observaron en las yemas apicales de *A. negundo* durante su cultivo *in vitro* a los 30 y 60 días respectivamente (Figura 2). Por otra parte, porcentajes altos de supervivencia se observaron en las yemas axilares. (Figura 2).



Figura 1. Explantes de *Acer negundo* durante el establecimiento *in vitro*: (A) Yema apical contaminada con hongo y necrosis; (B) Yema axilar contaminada con hongo y oxidación; (C) Yema apical con óptima supervivencia y desarrollo de brote inicial; (D) Yema axilar con óptima supervivencia y desarrollo de brote inicial. A los 21 días de cultivo.

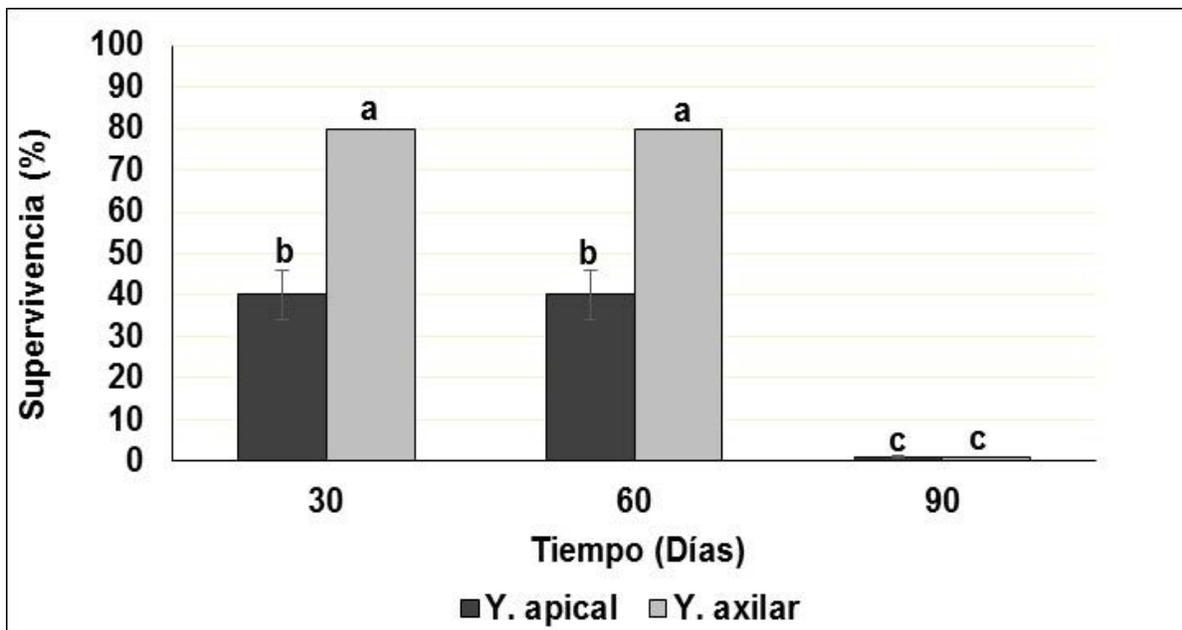


Figura 2. Colecta No.1. Septiembre-October 2015. Porcentaje de supervivencia (%) en yemas apicales y axilares de *Acer negundo*, cultivadas *in vitro* en MS con 0.05 mg/L de Benciladenina (BA) (n=7 p<0.05 Tukey-Kramer). A los 30, 60 y 90 días de cultivo. Letras diferentes muestran diferencia significativa.

Sin embargo, estos porcentajes disminuyeron hasta 0% a los 90 días de cultivo para ambos tipos de explante. Los signos de oxidación y/o necrosis se observaron en las yemas apicales y axilares a los 60 días de cultivo (Figura 3C y 3D).

Los explantes de esta colecta presentaron exudados blancos en la base y extremos laterales de las yemas a los 30 días durante su cultivo *in vitro*. Los exudados fueron más notorios en las yemas axilares con respecto a las yemas apicales (Figura 3A y 3B).

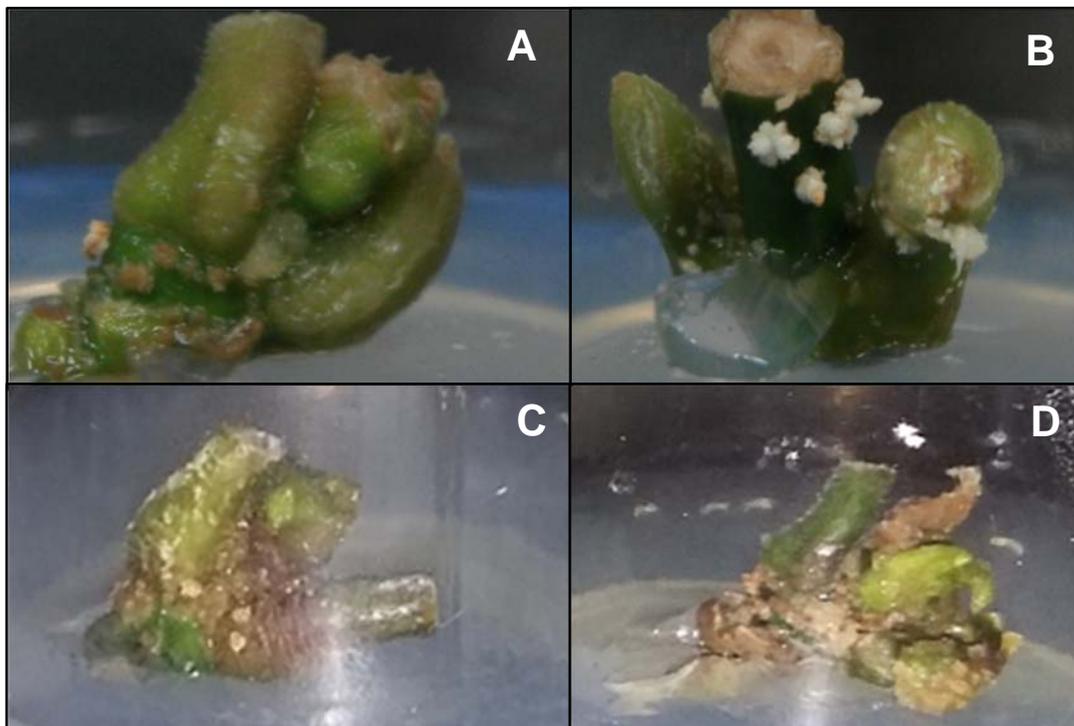


Figura 3. Colecta No. 1. Septiembre-Octubre 2015. Explantes de *Acer negundo* en cultivo *in vitro*: (A) Yema apical con buen desarrollo y presencia de exudados a 30 días de cultivo; (B). Yema axilar con buen desarrollo y presencia de exudados a 30 días de cultivo; (C) Yema apical con signos de oxidación a 60 días de cultivo; (D) Yema axilar con signos de oxidación y necrosis a 60 días de cultivo

VIII.2.2. Colecta No. 2 Diciembre 2015-Enero 2016

Los porcentajes de supervivencia fueron del 100% en yemas apicales y axilares de *A. negundo* a los 30 días de cultivo (Figura 4). Ambos tipos de explantes mostraron un buen desarrollo de brote inicial. (Figura 5A y 5B). Sin embargo; estos porcentajes de supervivencia disminuyeron hasta 0% a partir de los 60 días (Figura 4). Signos severos de necrosis se observaron en las yemas apicales y axilares a partir de los 60 días (Figura 5C y 5D). Cabe mencionar, que la presencia de exudados no se observó en los explantes correspondientes a esta colecta durante su cultivo *in vitro*.

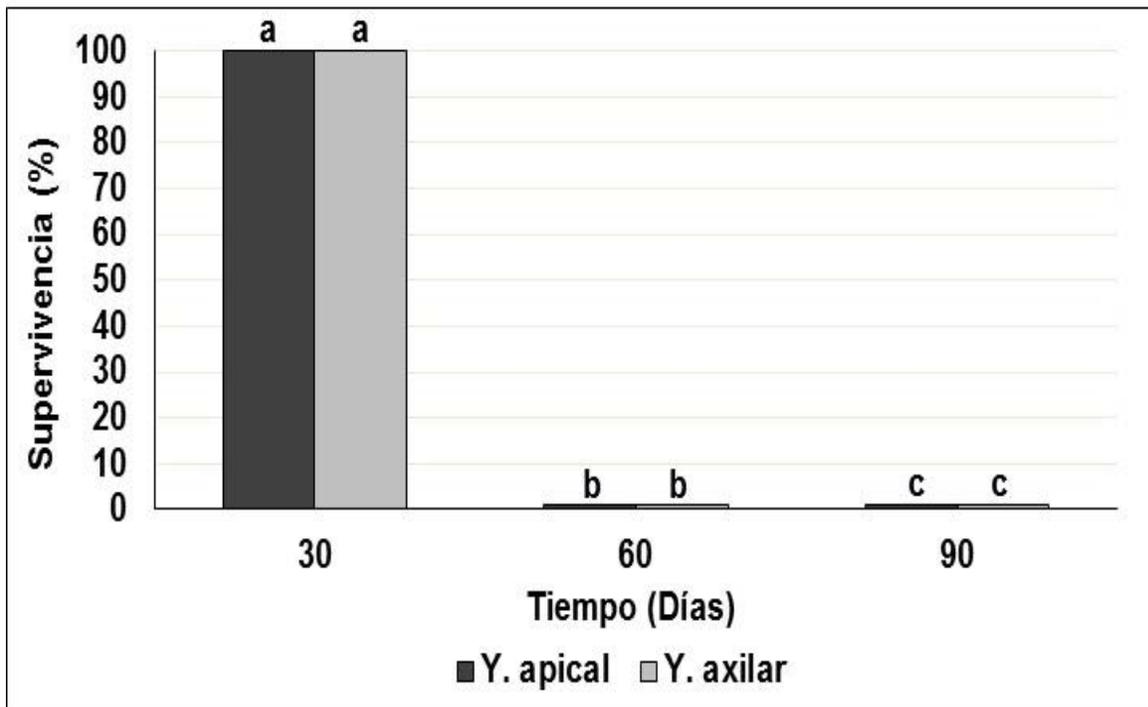


Figura 4. Colecta No. 2. Diciembre 2015-Enero 2016. Porcentaje de supervivencia (%) en yemas apicales y axilares de *Acer negundo*, cultivadas *in vitro* en MS con 0.05 mg/L de Benciladenina (BA) (n=7 p<0.05 Tukey-Kramer). A los 30, 60 y 90 días de cultivo. Letras diferentes muestran diferencia significativa.



Figura 5. Colecta No. 2. Diciembre 2015-Enero 2016. Explantes de *Acer negundo* en cultivo *in vitro*: (A) Yema apical con buen desarrollo de brote inicial a 30 días de cultivo; (B) Yema axilar con desarrollo de brote inicial a los 30 días de cultivo; (C) Yema apical con necrosis total a 60 días de cultivo; (D) Yema axilar con desarrollo de brote inicial, con necrosis total a 60 días de cultivo.

VIII.2.3. Colecta No. 3 Marzo-Abril 2016

Porcentajes de supervivencia del 100% se observaron en las yemas apicales y axilares de *A. negundo* a los 30 días de cultivo (Figura 6). Ambos tipos de explantes mostraron un buen desarrollo de brote inicial a los 30 días de cultivo (Figura 7A y 7B). La supervivencia disminuyó hasta en un 43% para las yemas apicales y en un 33% para las yemas axilares a los 60 días de cultivo. Estos valores de supervivencia permanecieron hasta los 90 días de cultivo. La diferencia en la supervivencia fue significativa (Figura 6).

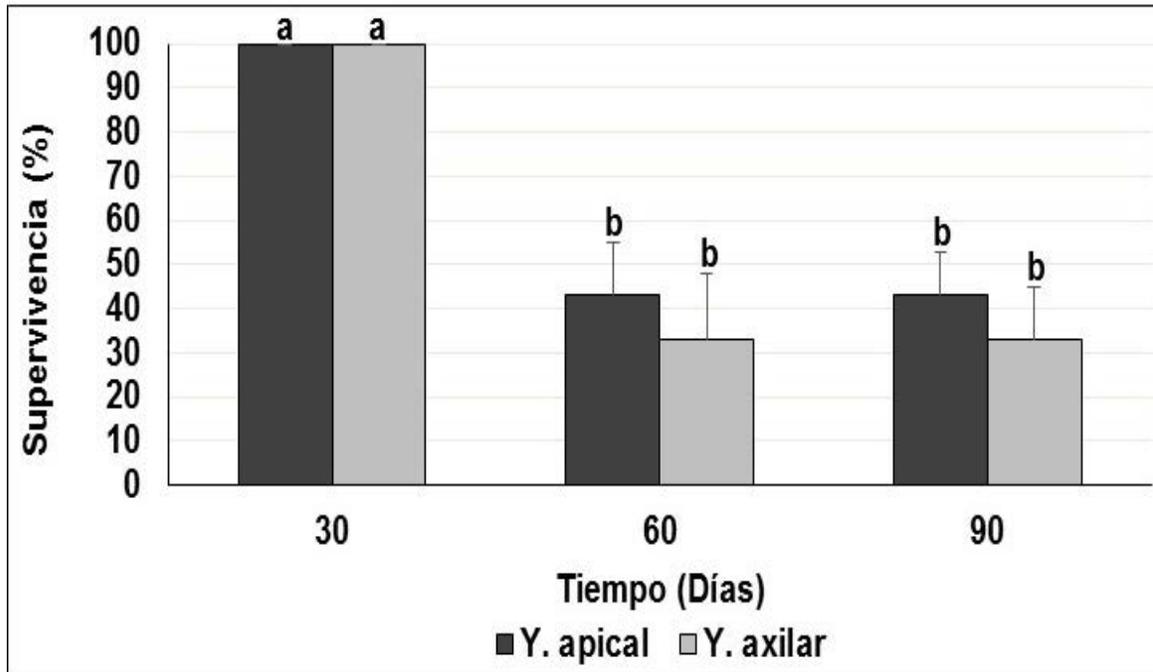


Figura 6. Colecta No. 3. Marzo-Abril 2016. Porcentajes de supervivencia (%) en yemas apicales y axilares de *Acer negundo*, cultivadas *in vitro* en MS con 0.05 mg/L de Benciladenina (BA) (n=7 p<0.05 Tukey-Kramer). A los 30, 60 y 90 días de cultivo. Letras diferentes muestran diferencia significativa.



Figura 7. Colecta No. 3. Marzo-Abril 2016. Explantes de *Acer negundo* en cultivo *in vitro*: (A) Yema apical con desarrollo de brote inicial a 30 días de cultivo; (B) Yema axilar con desarrollo de brote inicial a 30 días de cultivo; (C) Yema apical con desarrollo de brote y formación de folíolos a 60 días de cultivo; (D) Yema axilar con desarrollo de brote y formación de folíolos a 60 días de cultivo.

Un buen desarrollo de brote inicial se observó para ambos tipos de explantes. La formación de algunos folíolos se observó en yemas apicales y axilares a los 60 días de cultivo (Figura 7C y 7D). Los porcentajes de supervivencia y características de desarrollo de los explantes se mantuvieron constantes hasta los 90 días de cultivo.

VIII.2.3.1. Colecta No. 3. Supervivencia (formación de brotes)

Las yemas apicales y axilares de *A. negundo* supervivientes y con formación de brote inicial se recultivaron 60 días en medio MS con las diferentes combinaciones y concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA).

Las yemas apicales cultivadas en los tratamientos T1 (0.05 mg/L BA), T2 (0.1 mg/L ANA y 0.5 mg/L BA), T5 (0.5 mg/L ANA y 1.0 mg/L BA) y T6 (1.0 mg/L ANA y 2.0 mg/L BA) mostraron un 100% de supervivencia a los 30 días de cultivo (Figura 8A). Los tratamientos T0 (0, 0 ANA/BA), T3 (0.5 mg/L ANA y 0.5 mg/L BA) y T4 (0.1 mg/L ANA y 1.0 mg/L BA) mostraron porcentajes de supervivencia menores o igual al 33% (Figura 8A). Los valores de supervivencia fueron significativos entre tratamientos a los 30 días de cultivo. A los 60 días del cultivo, los porcentajes de supervivencia para todos los tratamientos (T0-T6) no fueron mayores al 50% (Figura 8A).

Las yemas axilares procedentes de los tratamientos T1, T5 y T6 mostraron un 100% de supervivencia a los 30 días de cultivo. Los tratamientos T0, T2, T3 y T4 presentaron porcentajes de supervivencia menores a 70 % (Figura 8B). Diferencia significativa se presentó entre tratamientos.

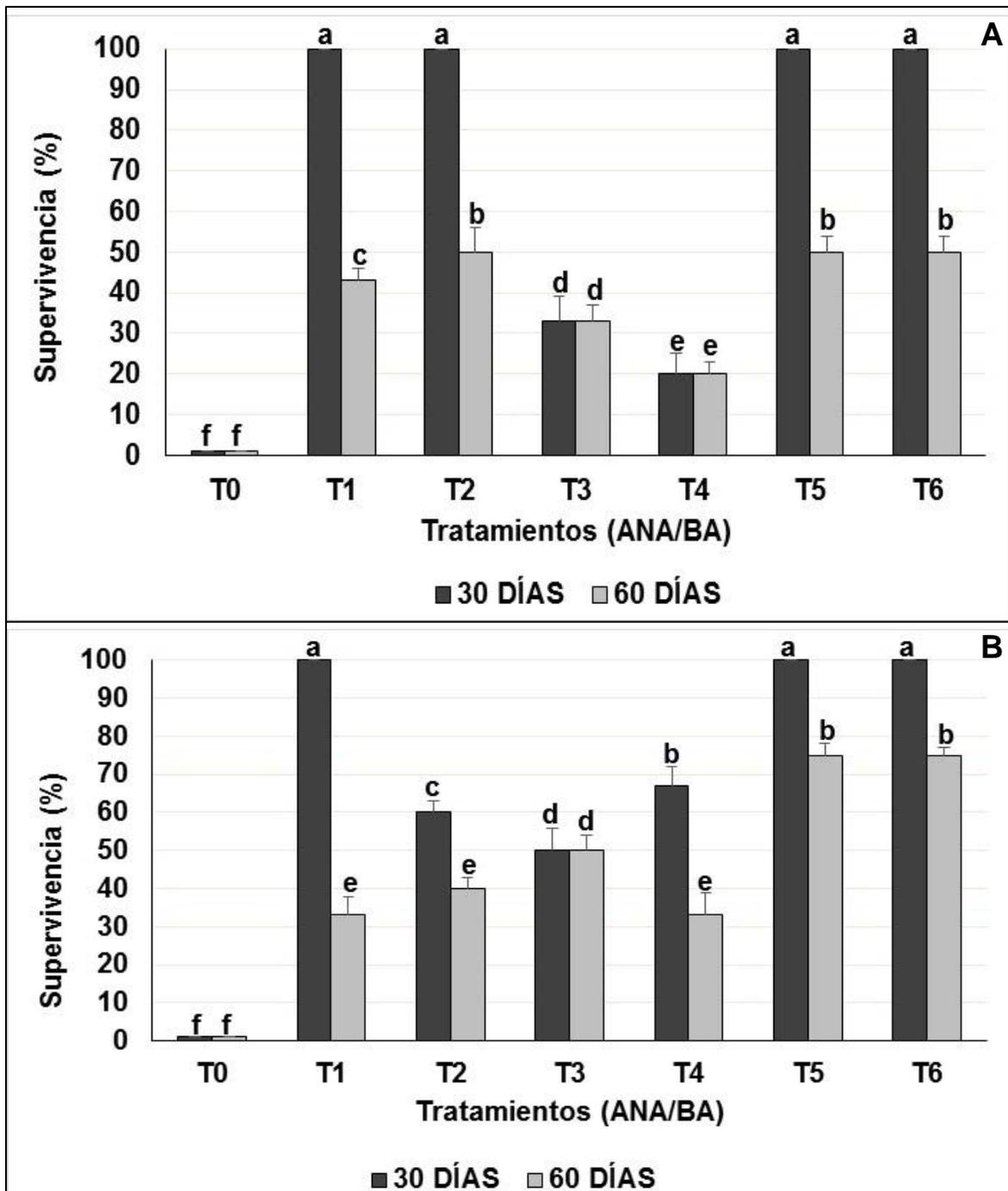


Figura 8. Colecta No. 3 Marzo-Abril 2016. Porcentaje de supervivencia (%) en yemas apicales (A) y axilares (B) de *Acer negundo*, cultivadas *in vitro* en MS en diferentes tratamientos de brotación: T0 (0, 0 ANA/BA); T1 (0.05 mg/L BA); T2 (0.1 mg/L ANA y 0.5 mg/L BA); T3 (0.5 mg/L ANA y 0.5 mg/L BA); T4 (0.1 mg/L ANA y 1.0 mg/L BA); T5 (0.5 mg/L ANA y 1.0 mg/L BA); y T6 (1.0 mg/L ANA y 2.0 mg/L BA) (n=7 p<0.05 Tukey-Kramer). A los 30 y 60 días de cultivo. Letras diferentes muestran diferencia significativa.

A los 60 días de cultivo, las yemas axilares de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4 mostraron porcentajes de supervivencia menores al 50%. Mientras las yemas axilares de los tratamientos T5 y T6 presentaron valores de supervivencia del 75% (Figura 8B).

VIII.2.3.2. Colecta No. 3. Porcentaje de brotación

Las yemas apicales de *A. negundo* en los tratamientos T2 (0.1 mg/L ANA y 0.5 mg/L BA) y T6 (1.0 mg/L ANA y 2.0 mg/L BA) mostraron un 100% de brotación a los 30 días de cultivo (Figura 9A). En los tratamientos T5 (0.5 mg/L ANA y 1.0 mg/L BA), T1 (0.05 mg/L BA), T3 (0.5 mg/L ANA y 0.5 mg/L BA) y T4 (0.1 mg/L ANA y 1.0 mg/L BA) mostraron valores de supervivencia entre 20 y 75 %. (Figura 9A). Los porcentajes de brotación para los tratamientos T2, T5 y T6 disminuyeron hasta un 50% a los 60 días de cultivo. Además el porcentaje disminuyó a menos del 34% en los tratamientos T0, T1, T3 y T4, al mismo periodo de cultivo.

A los 30 días del cultivo, las yemas axilares mostraron un 100% de brotación en el tratamiento T6. En los tratamientos T2, T3, T4 y T5, los porcentajes de brotación fueron iguales o mayores al 50%. Sin embargo, los porcentajes fueron de 0% y de 33% en los tratamientos T0 y T1 respectivamente (Figura 9B). Los mayores porcentajes de brotación (75%) se observaron en los tratamientos T5 y T6 a los 60 días de cultivo. Diferencia significativa se observó en todos los casos.

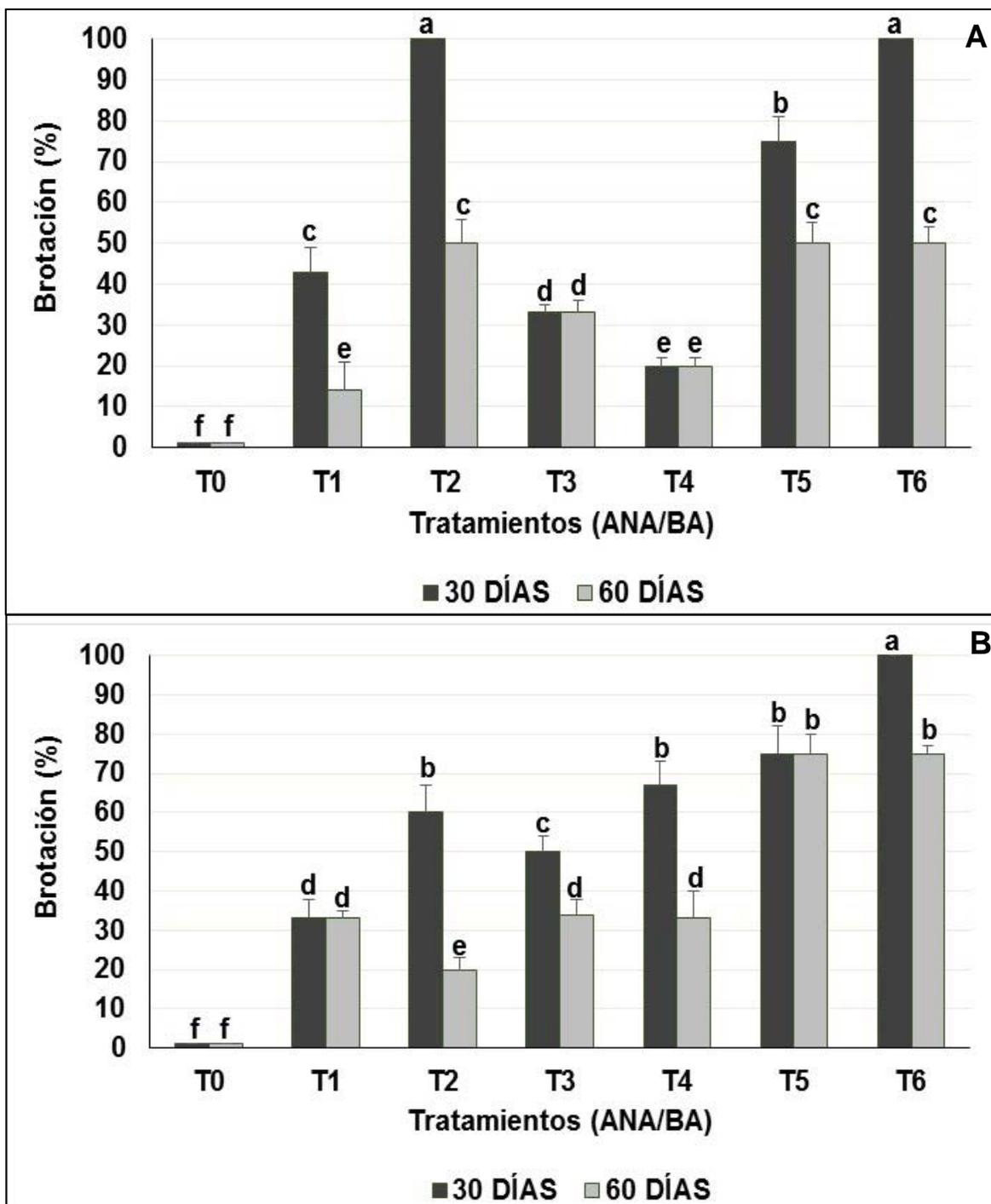


Figura 9. Colecta No. 3 Marzo-Abril 2016. Porcentaje de brotación (%) en yemas apicales (A) y axilares (B) de *Acer negundo*, cultivadas *in vitro* en MS en diferentes tratamientos de formación de brotes: T0 (0, 0 ANA/BA); T1 (0.05 mg/L BA); T2 (0.1 mg/L ANA y 0.5 mg/L BA); T3 (0.5 mg/L ANA y 0.5 mg/L BA); T4 (0.1 mg/L ANA y 1.0 mg/L BA); T5 (0.5 mg/L ANA y 1.0 mg/L BA); y T6 (1.0 mg/L ANA y 2.0 mg/L BA) (n=7 p<0.05 Tukey-Kramer). A los 30 y 60 días de cultivo. Letras diferentes muestran diferencia significativa.

En las figuras 10A y 10B, se muestra el desarrollo de brote en yema apical y axilar, respectivamente, que correspondieron al resultado de los tratamientos T5 y T6 a los 60 días de cultivo.

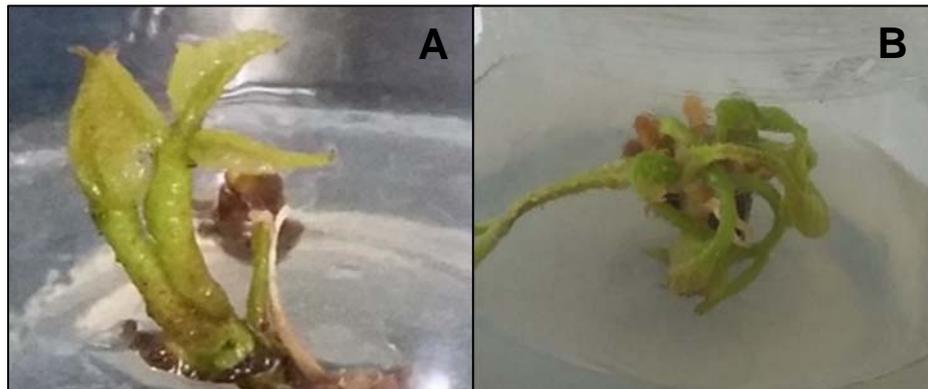


Figura 10. Colecta No.3. Marzo-Abril 2016. Brotación de *Acer negundo* en cultivo *in vitro*: (A) Brotes formados en yema apical en MS con el tratamiento T5 (0.5 mg/L ANA y 1.0 mg/L BA); (B) Brotes formados en yema axilar en MS con el tratamiento T6 (1.0 mg/L ANA y 2.0 mg/L BA). A los 60 días de cultivo.

VIII. 2.4. Colecta No. 4. Junio-Julio 2016. Supervivencia (formación de brotes)

Las yemas apicales de *A. negundo* en los tratamientos T0 (sin reguladores de crecimiento) y T3 (0.5 mg/L ANA y 0.5 mg/L BA) mostraron un 100% de supervivencia en la etapa de brotación a los 30 días de cultivo. Los tratamientos T1 (0.05 mg/L BA), T2 (0.1 mg/L ANA y 0.5 mg/L BA), T4 (0.1 mg/L ANA y 1.0 mg/L BA), T5 (0.5 mg/L ANA y 1.0 mg/L BA) y T6 (1.0 mg/L ANA y 2.0 mg/L BA) tuvieron porcentajes de supervivencia mayores o iguales a 80% a los 30 días de cultivo (Figura 11A). Diferencia significativa se presentó entre tratamientos.

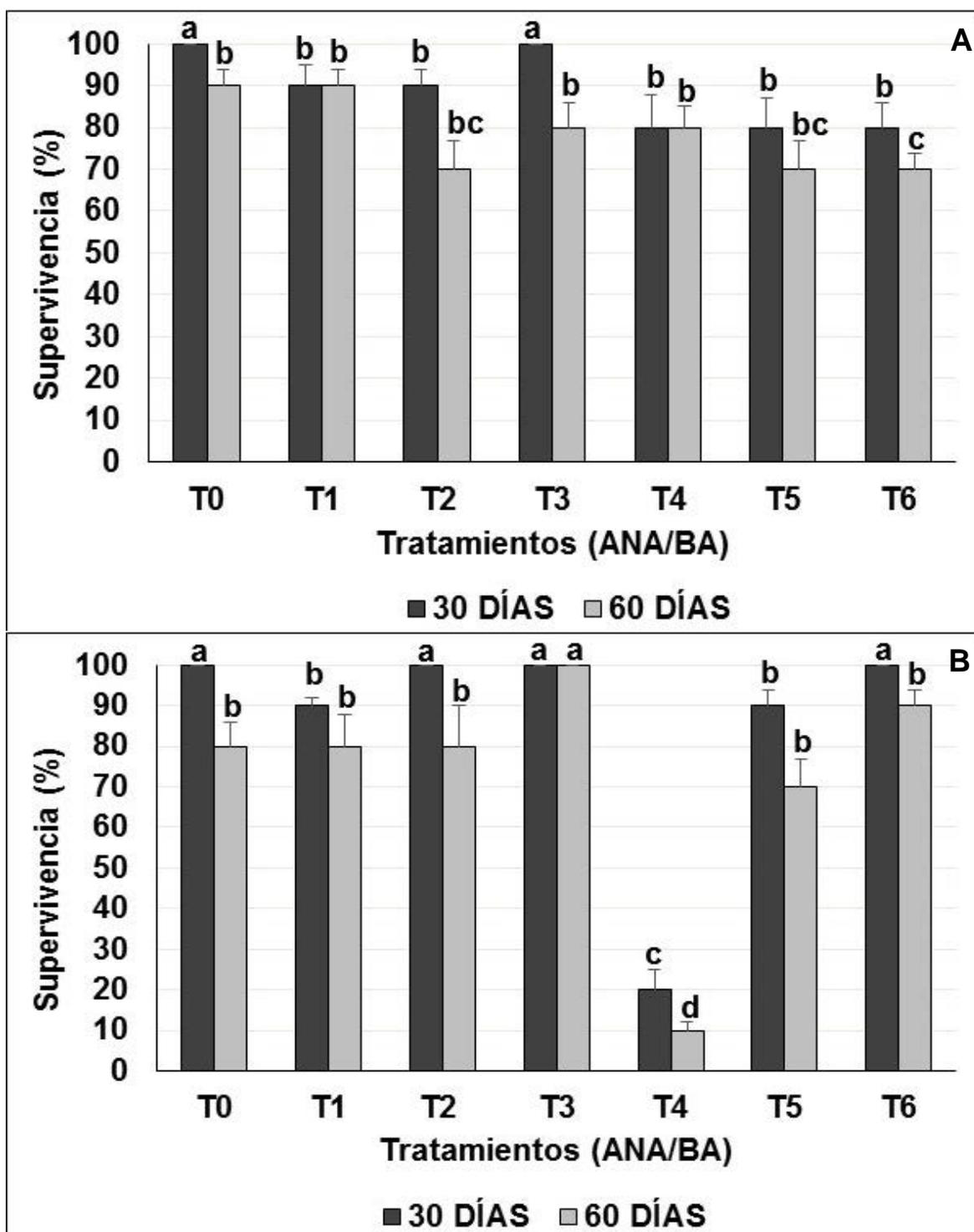


Figura 11. Colecta No. 4. Junio-Julio 2016. Porcentajes de supervivencia (%) en yemas apicales (A) y axiales (B) de *Acer negundo*, cultivadas *in vitro* en MS con los tratamientos: T0 (0, 0 ANA/BA); T1 (0.05 mg/L BA); T2 (0.1 mg/L ANA y 0.5 mg/L BA); T3 (0.5 mg/L ANA y 0.5 mg/L BA); T4 (0.1 mg/L ANA y 1.0 mg/L BA); T5 (0.5 mg/L ANA y 1.0 mg/L BA); y T6 (1.0 mg/L ANA y 2.0 mg/L BA). A los 30 y 60 días de cultivo (n=7 p<0.05 Tukey-Kramer). Letras diferentes muestran diferencia significativa.

A los 60 días de cultivo, solo las yemas apicales cultivadas en los tratamientos T0 y T1 mostraron los porcentajes de supervivencia más altos (90%). En los demás tratamientos, los porcentajes de supervivencia disminuyeron al mismo periodo de cultivo (Figura 11A).

Las yemas axilares de *A. negundo* mostraron un 100% de supervivencia en varios de los tratamientos (T0, T2, T3 y T6). Los tratamientos T1 y T5 tuvieron 90% de supervivencia a los 30 días de cultivo y el tratamiento T4 mostró solamente un 20% de supervivencia al mismo periodo de cultivo (Figura 11B).

Las yemas axilares en los tratamientos T3 y T6 mantuvieron los más altos porcentajes de supervivencia a los 60 días de cultivo. Al mismo periodo de cultivo, las yemas axilares cultivadas en los tratamientos T0, T1, T2 y T5 mostraron porcentajes de supervivencia $\geq 70\%$. Las yemas del tratamiento T4 mostraron solamente un 10% de supervivencia (Figura 11B).

Tanto las yemas apicales como axilares de *A. negundo* mostraron la formación y el desarrollo de brote inicial. Las yemas axilares presentaron exudados blancos en sus bases y extremos laterales. Esta característica se observó durante el cultivo *in vitro* a los 30 y 60 días (Figuras 12C y 12D).

VIII. 2.4.1. Colecta No. 4 Junio-Julio. Formación de brotes

La formación de brotes en las yemas apicales de *A. negundo* fue del 90% en los tratamientos T1 (0.05 mg/L BA) y T3 (0.5 mg/L ANA y 0.5 mg/L BA) a los 30 días de cultivo. Los demás tratamientos mostraron porcentajes de brotación entre el 70 y 80% (Figura 13A). La diferencia entre valores de brotación fue significativa entre tratamientos.

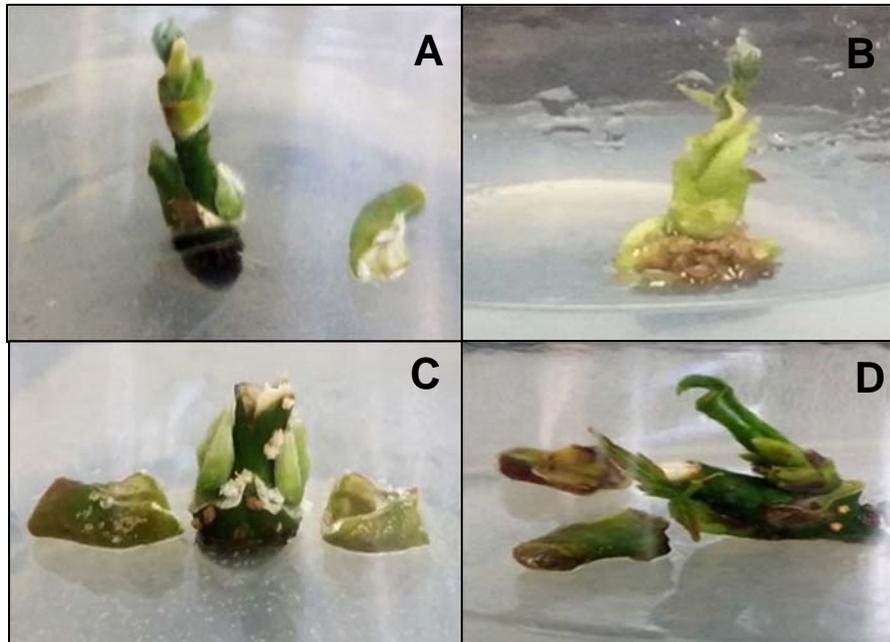


Figura 12. Colecta No. 4. Junio-Julio 2016. Explantes de *Acer negundo* en cultivo *in vitro*: (A) Yema apical cultivada en MS (Tratamiento T1, 0.05 mg/L BA), 30 días de cultivo; (B) Yema apical cultivada en MS (Tratamiento T1, 0.05 mg/L BA), a los 60 días de cultivo; (C) Yema axilar cultivada en MS (Tratamiento T1, 0.05 mg/L BA), a los 30 días de cultivo; (D) Yema axilar cultivada en MS (Tratamiento T1, 0.05 mg/L BA).

A los 60 días de cultivo, las yemas apicales de todos los tratamientos, a excepción del T4, mantuvieron porcentajes de brotación entre un 60% y 80%, sin diferencias significativas entre ellos. El T4 presentó un porcentaje de supervivencia de 50% (Figura 13A).

Las yemas axilares cultivadas por 30 días en el tratamiento T3 mostraron el valor más alto de brotación. A este tiempo de cultivo, en los tratamientos T0, T1 y T2 tuvieron porcentajes de brotación entre un 80% y 90%, con valores de un 70% de brotación en los tratamientos T4, T5 y T6 (Figura 13B). Estas diferencias fueron significativas.

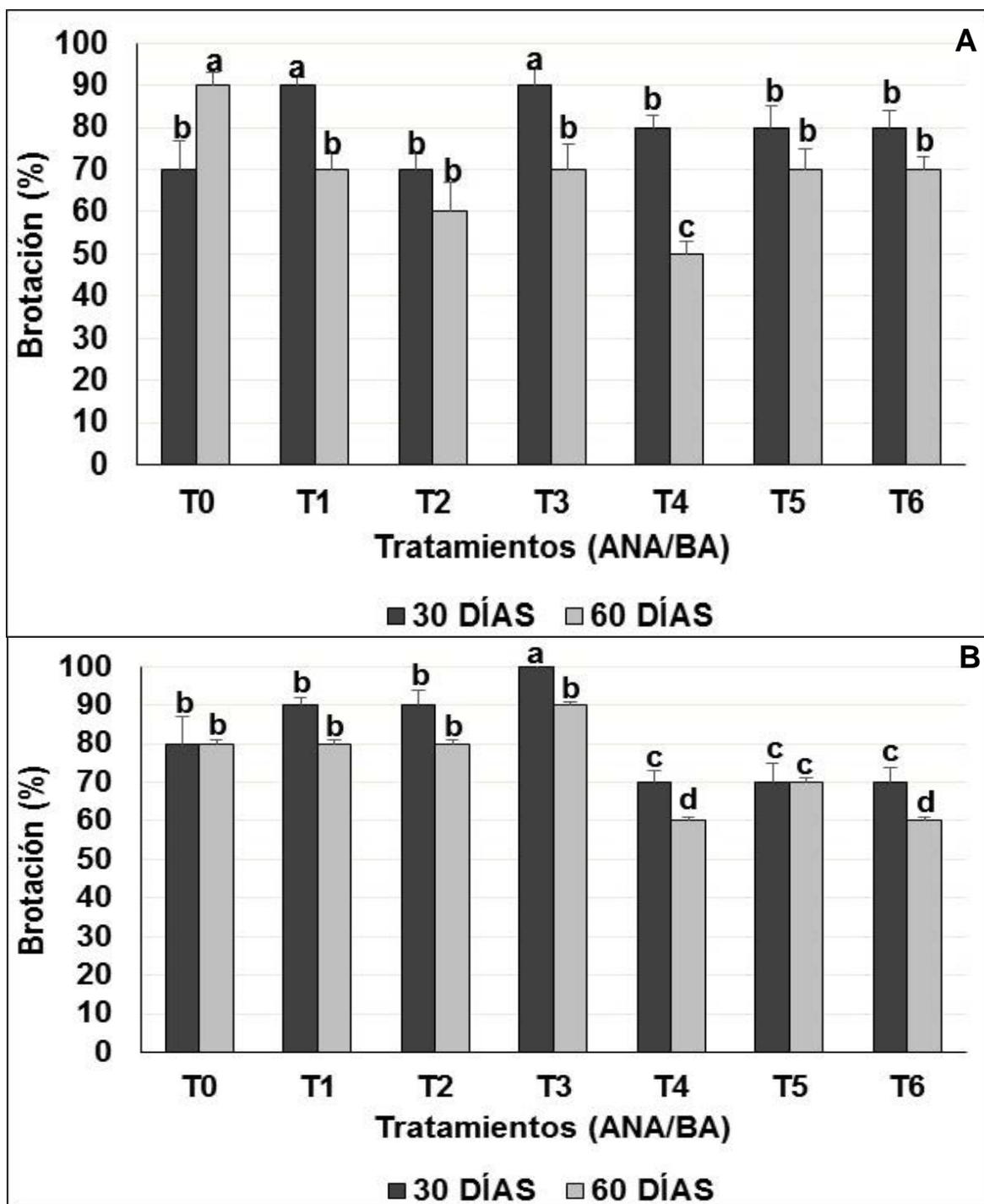


Figura 13. Colecta No. 4. Junio-Julio 2016. Porcentaje de brotación (%) en yemas apicales (A) y axilares (B) de *Acer negundo*, cultivadas *in vitro* en MS con los tratamientos: T0 (0, 0 ANA/BA); T1 (0.05 mg/L BA); T2 (0.1 mg/L ANA y 0.5 mg/L BA); T3 (0.5 mg/L ANA y 0.5 mg/L BA); T4 (0.1 mg/L ANA y 1.0 mg/L BA); T5 (0.5 mg/L ANA y 1.0 mg/L BA); y T6 (1.0 mg/L ANA y 2.0 mg/L BA). A los 30 y 60 días de cultivo. (n=7 p<0.05 Tukey-Kramer). Letras diferentes muestran diferencia significativa.

A los 60 días de cultivo, el valor más alto de brotación se presentó en el tratamiento T3. Los tratamientos T0, T1 y T2 mostraron un 80% de brotación. La brotación en el tratamiento T5 fue del 70% y en los T4 y T6 solamente de un 60% (Figura 13B). La Figura 14 muestra el desarrollo de brote en yemas apicales (A) y axilares (B) de *A. negundo* a los 60 días de cultivo.

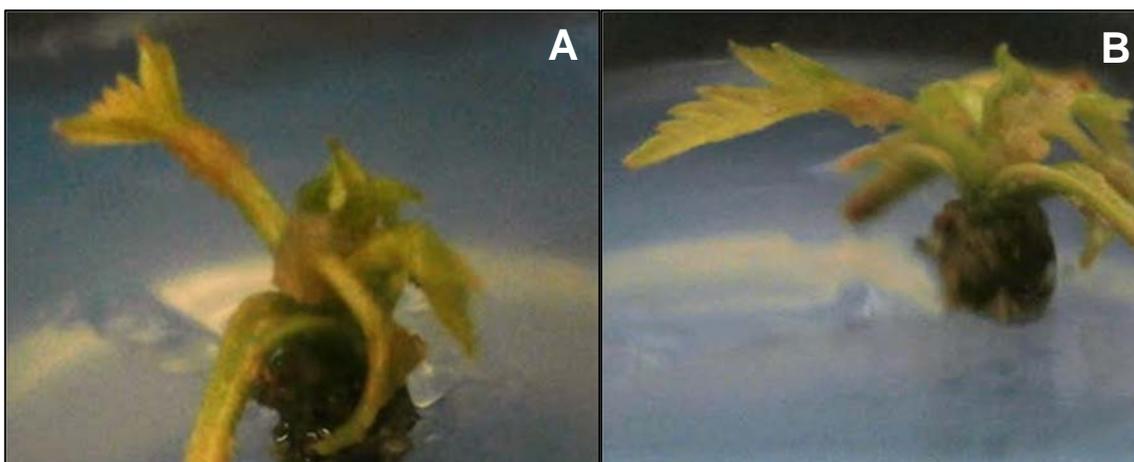


Figura 14. Colecta No. 4. Junio- Julio 2016. Brotes de *Acer negundo* en cultivo *in vitro*: (A) Brotes en yema apical en MS con el tratamiento T5 (0.5 mg/L ANA y 1.0 mg/L BA); (B) Brotes en yema axilar en MS con el tratamiento T6 (1.0 mg/L ANA y 2.0 mg/L BA). A los 60 días de cultivo.

VIII. 3. BROTACIÓN Y ENRAIZADO DE ESTACAS

VIII. 3.1. Sitio 1. Centro de Convenciones

La supervivencia en las estacas de *A. negundo* fue baja en el tratamiento control T0 (sin auxina comercial (Raizone-Plus®) y sin fungicida (Tecto-60)) a los 15 días de cultivo. Este porcentaje disminuyó hasta un 0% a los 30 días de cultivo. En contraste, las estacas con T1 (Raizone-Plus®, 10 ppm + Tecto-60) y T2 (Raizone-Plus®, polvo+Tecto-60) mostraron el 100% de supervivencia a los 15 días de cultivo. Los porcentajes de supervivencia se mantuvieron en 80% para las estacas del tratamiento T1, y en un 90% para las del tratamiento T2, a los 30 días de cultivo (Cuadro 15).

Cuadro 15. Porcentajes de supervivencia, enraizado y número de brotes, en estacas de *Acer negundo* de Sitio 1, con los tratamientos de la auxina comercial: T0 (sin Raizone-Plus® y sin Tecto-60); T1 (Raizone-Plus® 10 ppm + Tecto-60); y T2 (Raizone-Plus® polvo+Tecto-60). A los 15 y 30 días de cultivo.

Tratamiento	Tiempo (días)	Supervivencia (%)	Enraizado (%)	Brotes (No.)
0 Raizone-Plus® Tecto-60	15	10	0	0
	30	0	0	0
1 Raizone-Plus® 10 ppm+Tecto-60	15	100	80	1.2
	30	80	80	1.4
2 Raizone-Plus® Polvo+Tecto-60	15	100	100	1.9
	30	90	90	2.3

Las estacas del tratamiento control (T0) no formaron raíces en ninguno de los dos periodos de evaluación. Los porcentajes más altos de enraizado se observaron en las estacas del tratamiento T2 a los 15 y 30 días respectivamente (Cuadro 15; Figura 15B). Por otra parte, las estacas con el tratamiento T1 mostraron 80% de enraizado tanto a los 15 como a los 30 días de cultivo (Cuadro 15; Figura 15A).

La formación de brotes se presentó únicamente en las estacas con los tratamientos T1 y T2. El tratamiento T1 promovió la formación de brotes con 1.2 y 1.4 brotes/estaca en promedio a los 15 y 30 días de cultivo respectivamente. Con respecto al tratamiento T2, 1.9 y 2.3 brotes/estaca se formaron en promedio a los 15 y 30 días de cultivo (Cuadro 15).



Figura 15. Respuesta al enraizado en estacas de *Acer negundo* colectadas en Sitio 1: (A) Estacas sembradas en contenedor con el tratamiento T1 (Raizone-Plus® 10 ppm + Tecto-60); (B) Estacas sembradas en contenedor con el tratamiento T2 (Raizone-Plus® polvo+Tecto-60). A los 15 días de cultivo.

VIII. 3.2. Sitio 2. Bosque de galería

Las estacas de *A. negundo*, procedentes de bosque de galería, mostraron un 100% de supervivencia en todos los tratamientos que se establecieron para este experimento a los 15 días de cultivo. Las estacas procedentes de los tratamientos T1, T3 y T4 mostraron un 80% de supervivencia después de los 15 días de cultivo. Por otra parte, los porcentajes más bajos de supervivencia (40%) se presentaron en los tratamientos T0 y T2 a los 45 días de cultivo (Cuadro 16).

Cuadro 16. Porcentajes de supervivencia, de enraizado y número de brotes y de raíces en estacas de *Acer negundo* colectadas en Sitio 2, en los tratamientos de: T0 (Sin Radix 10000® - Sin Tecto-60); T1 (Sin Radix 10000® +Tecto-60); T2 (Radix 10000® 1ppm + Tecto-60); T3 (Radix10000® 5 ppm + Tecto-60); y T4 (Radix 10000® 10 ppm + Tecto-60). A los 15, 30 y 45 días de cultivo.

Tratamiento	Tiempo (días)	Supervivencia (%)	Enraizado (%)	Brotes (No.)	Raíces (No.)
0 Radix 10,000® Tecto-60	15	100	0	0.8	0
	30	60	0	0.8	0
	45	40	0	0.4	0
1 -Radix 10,000® +Tecto-60	15	100	0	0.8	0
	30	100	0	1.4	0
	45	80	0	1.0	0
2 Radix, 1 ppm +Tecto-60	15	100	0	1.0	0
	30	60	20	1.2	0.2
	45	40	20	1.2	0.6
3 Radix, 5 ppm +Tecto-60	15	100	20	1.0	0.2
	30	80	20	1.2	0.4
	45	60	20	1.2	0.4
4 Radix, 10 ppm +Tecto-60	15	100	20	1.2	0.8
	30	80	20	1.2	1.4
	45	60	20	0.4	1.4

Las estacas de los tratamientos T0 y T1 no mostraron formación de raíces en ninguno de los tres periodos de evaluación (15, 30 y 45 días de cultivo). El porcentaje de enraizado de estacas (20%) se mantuvo constante en los tres periodos de evaluación en los tratamientos T2, T3 y T4, con excepción de las estacas del tratamiento T2, las cuales presentaron dicho porcentaje a partir de los 30 días de cultivo (Cuadro 16).

Las estacas de los tratamientos T2 y T3 presentaron 0.2 raíces/estaca correspondiente a los 30 y 15 días respectivamente. El mayor número de raíces/estaca (1.4) se observó en el tratamiento T4 a partir de los 30 días de cultivo (Cuadro 16).

El mayor número de brotes se presentó en las estacas tratadas solo con el fungicida a los 30 días de cultivo. Por el contrario, el menor número de brotes se presentó en las estacas no tratadas (T0) y en el tratamiento T4 a los 45 días de cultivo (Cuadro 16).

IX. DISCUSIÓN

IX.1. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE ASEPSIA Y TIPO DE EXPLANTE

Un factor importante a controlar en el establecimiento fue la supervivencia de los explantes (yemas apicales y axilares) de *Acer negundo* de acuerdo a los resultados de esta investigación. Esta variable se relaciona directamente con la calidad del explante, el medio de cultivo y el tratamiento de asepsia. Los resultados del cuadro 8 demuestran lo anterior. Los contaminantes y la oxidación de los tejidos son causa principal de bajos porcentajes de supervivencia (Cassells, 1991 citado por Uribe, 2008) y llevan a grandes pérdidas en el proceso del establecimiento *in vitro*. Por tal razón, la eliminación de ambos factores desde la etapa de establecimiento fue importante.

Los altos porcentajes de contaminación de yemas apicales y axilares con las rutinas de asepsia R1, R2 y R3 demostraron la baja eficiencia en la desinfección superficial de dichos explantes. Esto coincide con lo reportado previamente (Alvarado, 1998 citado por Uribe, 2008). Además, Hernández y González (2010) indican que los agentes vitropatógenos (hongos, bacterias y levaduras) pueden ser dañinos para el cultivo de tejidos vegetales; aunque no son necesariamente patógenos para las plantas, sí son perjudiciales para células, tejidos u órganos cultivados *in vitro*.

Un bajo porcentaje de contaminación por hongos se observó con la aplicación de la rutina cuatro (R4) en relación a las otras tres rutinas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Hernández-García (2014) para cultivos *in vitro* de *Dalbergia congestiflora* Pittier. La efectividad fue debida a la doble aplicación del fungicida sistémico Tecto 60 y a la doble desinfección con hipoclorito de sodio en los dos tipos de explantes. Esto confirma lo señalado por Hernández y González (2010), quienes reportan que con la aplicación de un fungicida comercial se logra una eliminación de hasta el 50% de hongos filamentosos en *Eucalyptus grandis*.

Además de la contaminación microbiana, otra limitante en el establecimiento *in vitro* de cultivos vegetales es el daño causado por la necrosis y esto sucede especialmente en especies leñosas (Azofeifa, 2009). Marks y Simpson (1990) demostraron que el mecanismo de oxidación fenólica y la inhibición del crecimiento en plantas leñosas pueden ser controlados, por el nivel de irradiación recibido por la planta donante. Los mismos autores, en su investigación con arbustos ornamentales de *Hamamelis sp.*, redujeron considerablemente la oxidación en los explantes cuando éstos fueron tomados de plantas que crecieron en oscuridad total.

León *et al.* (1997) encontraron en guayabo (*Psidium guajava*) una disminución del contenido de compuestos fenólicos en los explantes con la protección solar de las ramas de la planta. En el presente estudio, por el contrario, la mayor incidencia de oxidación y necrosis se presentó en los explantes de *A. negundo* colectados de la zona menos irradiada. Dicho efecto fue aún más marcado en las yemas apicales con respecto a las yemas axilares. Al respecto, Das y Mitra (1990) encontraron, en relación a la ubicación de los explantes en la planta donadora en el cultivo *in vitro* de *Eucalyptus tereticornis*, mayor propensión a oxidarse las yemas de brotes apicales terminales del tronco principal que las yemas en las ramas laterales basales.

Dalal *et al.* (1999) encontraron un comportamiento similar en el cultivo de uva. Ellos señalan que la respuesta se debe al mayor contenido de sustancias fenólicas en los brotes apicales.

El tamaño y el tipo de explante incrementan la presencia de contaminantes *in vitro*, pues mientras mayor sea el explante, es más difícil de desinfectar (Surga, 1994). En *Annona muricata* L., al evaluar el efecto del tipo de explante (ápice y segmentos nodales) sobre el establecimiento *in vitro* de esta especie, el porcentaje de contaminación por hongos aumentó a medida que la posición de los segmentos nodales se alejaba del ápice (Rivero, 2001). En este estudio, los resultados de asepsia mostraron los mayores porcentajes de contaminación y menores

porcentajes de supervivencia en las yemas apicales con respecto a las yemas axilares.

Los resultados *in vitro* de *A. negundo* llevan a proponer el cultivo de yemas axilares de un tamaño de 1.5 cm de largo, provenientes de la primera rama basal más cercana al fuste.

IX.2. SUPERVIVENCIA Y FORMACIÓN DE BROTES

La condición fisiológica de la planta fuente de los explantes es un factor importante en la respuesta *in vitro* durante la etapa del establecimiento, la formación y multiplicación de brotes (Pitekellabou, 2015).

Lo anterior confirma los resultados a la respuesta *in vitro* de las yemas apicales y axilares de *A. negundo* en la supervivencia durante la fase de establecimiento en este experimento. Los resultados de las Colectas 1 y 2 reflejaron porcentajes de mortalidad del 100% de los explantes a los 90 días de cultivo para ambos tipos de yemas.

En este sentido, Das y Mitra (1990) y Azofeifa (2009) observaron un limitado establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales por la presencia de oscurecimientos letales en los explantes (necrosis). En ocasiones el problema llega a ser tan severo, que en pocas horas el explante se oscurece y muere.

La generación del brote inicial en los explantes (yemas apicales y axilares) es otro aspecto importante a considerar y está relacionada con el balance hormonal endógeno de las yemas. Por ello, la estacionalidad tiene un efecto importante sobre la supervivencia y la respuesta a la formación de brotes en los explantes.

Los anteriores factores influyeron durante el establecimiento y en la respuesta *in vitro* de las yemas apicales y axilares de *A. negundo*, ya que un efecto positivo en

supervivencia y brotación se observó en la época primavera-verano correspondiente a las colectas 3 (Marzo-Abril) y 4 (Junio-Julio).

En la colecta 3, mayores porcentajes se observaron en supervivencia (100%, 30 días; 43%, 60 días; 43%, 90 días, para ambos tipos de explantes) (Figuras 6, 7 A-D); lo cual estuvo relacionado con la formación de brote inicial. Un efecto similar fue obtenido en los explantes de la Colecta 4; donde los porcentajes de supervivencia en yemas apicales fueron $\geq 80\%$, 30 días; $\leq 70\%$, 60 días y en yemas axilares $\geq 90\%$, 30 días; $\geq 70\%$, 60 días (Figuras 11A, 11B, 12 A-D); por lo que en éstos, los resultados fueron considerados como los mejores. Ambas colectas coincidieron con la etapa de floración y formación de brotes *de novo* en los árboles fuente de explantes de *A. negundo*.

La influencia de la época del año es muy clara en la respuesta *in vitro* de las yemas de *A. negundo*, ya que los más altos valores de supervivencia y de brotación se presentaron durante la época de primavera-verano. Esta respuesta confirma lo señalado por González *et al.* (2005), quienes reportaron, en un estudio realizado en *Coffea canephora* P. var. Robusta, una respuesta *in vitro* dependiente de la época del año de la colecta de los explantes y del genotipo. Esta respuesta se relaciona directamente con varios de los procesos fisiológicos del árbol en la época de primavera-verano. Los procesos son el incremento en la síntesis y en la actividad de las auxinas, los cuales desempeñan la principal función del crecimiento de la planta y desarrollo de brotes (Traore *et al.*, 2005).

El tipo de explante fue un factor que influyó en la supervivencia y respuesta *in vitro*. Su efecto se observó mayormente durante el establecimiento *in vitro* de las yemas apicales y axilares de *A. negundo* de las colectas 3 y 4. Los mejores resultados de brotación de la colecta 3 se obtuvieron en las yemas axilares con respecto a las apicales. En este sentido, como lo señalan Donoso (1988) y Uribe (2008), además de la estacionalidad, el tipo de explante tiene una marcada influencia con su

respuesta *in vitro*, lo cual interviene en el potencial morfogénético del material vegetal cultivado (Dodds y Roberts, 1995).

La formación y multiplicación de brotes en los explantes cultivados *in vitro* es influenciada por el tipo y cantidad de los reguladores de crecimiento (Orellana, 1998 citado por Uribe, 2008). Las mayores tasas de multiplicación de brotes son posibles con un balance adecuado de auxinas/citocininas. Esto se ha observado de manera general en todas las plantas, aunque la respuesta es dependiente de la concentración de cada regulador de crecimiento según la especie vegetal en estudio.

Kanungo *et al.* (2012), en un estudio de micropropagación de explantes nodales de árboles maduros de *Holarrhena antidysenterica* Wall., una especie leñosa, medicinal aromática, indican que la combinación de auxinas y citocininas fue esencial para producir una mejor formación y multiplicación de brotes. También, en yemas de *Pseudotsuga menziessi* Mirb. Franco cultivadas en bajas concentraciones de BA (0.011 a 0.045 mg/L), o sin la adición de ésta, hubo una mayor producción de brotes. Por el contrario, la formación de brotes no se observó en las yemas que fueron cultivadas en medio con altas concentraciones de BA (0.448 a 4.527 mg/L) (Traore *et al.*, 2005).

Caso contrario ha sido observado en diversas plantas, en las que es necesario adicionar mayores concentraciones de citocinina (≥ 1.0 mg/L) con un balance auxínico (≥ 0.1 mg/L), para conseguir un mayor número de brotes (Pérez-Molphe *et al.*, 1999). En explantes de *Colocasia esculenta*, cultivados en medio con 4.0 mg/L de BA, se observó el mayor número de brotes (Galvez *et al.*, 2013). Traore *et al.* (2005) destacan que con altas concentraciones de citocinina, se bloquea la extensión del meristemo apical de *Pseudotsuga menziessi* Mirb. Franco, pero se estimula la formación de brotes laterales.

Esta última respuesta fue observada en los explantes de *A. negundo*, ya que al cultivarse en concentraciones más altas tanto de la auxina (ANA) como de citocinina (BA), se obtuvieron los más altos porcentajes de brotación (Tratamiento T6); aunque la mejor formación de brotes, en ambos tipos de yemas, se observaron en los tratamientos T5 y T6 (Figuras 14A y 14B).

Los resultados obtenidos durante el establecimiento y la respuesta de brotación *in vitro* de yemas apicales y axilares de *A. negundo*, señalan que para lograr una óptima respuesta, las yemas deben ser colectadas en la época de verano (meses de Junio y Julio), cuando los árboles están en proceso de floración y rebrote. Es importante mencionar que las condiciones ambientales de cada año, también pueden influir en los resultados.

Respecto al tipo de explante, se propone que para conseguir óptimos resultados de brotación, deben seleccionarse yemas axilares de la zona más irradiada del árbol donante y cultivarse en concentraciones de BA, entre 0.5 y 2.0 mg/L a fin de lograr una respuesta de brotación *in vitro* adecuada.

IX. 3. BROTAÇÃO Y ENRAIZADO DE ESTACAS

Aunque la propagación por estacas es un método simple, en especies leñosas es un proceso muy complejo, debido a los múltiples factores que influyen sobre el enraizado de éstas. Entre estos factores, los principales son: la fuente de material, sin importar la edad de la plantas, se recomienda obtener estacas de ramas juveniles, con brotes erectos y vigorosos, que se localizan en la parte basal de los árboles; el manejo de la planta donante, ésta debe de presentar un buen estado nutricional, cultivada en óptimas condiciones de suelo y de humedad; la longitud y diámetro de las estacas; la presencia de hojas y yemas; los tratamientos con fitohormonas; y las condiciones de siembra como el tipo de sustratos, iluminación, temperatura y humedad relativa (Gárate, 2010).

En este estudio, con la aplicación de enraizadores comerciales conteniendo ácido indolbutírico (AIB), las estacas de *A. negundo* procedentes del Sitio 1 (Centro de Convenciones), mostraron los mejores resultados de supervivencia (90%), enraizado (90%) y brotación (2.3 brotes/estaca) al cultivarse en el tratamiento T2, que los obtenidos en las estacas procedentes del Sitio 2 (Bosque de galería), que aunque sobrevivieron en un 100%, no respondieron a la formación de raíces y presentaron un menor número de brotes (1.4 brotes/estaca) (Cuadros 15 y 16).

En la propagación vegetativa por estacas y estaquillas de plantas leñosas, la aplicación de (AIB), como auxina exógena, se ha utilizado ampliamente. Existen diferentes marcas comerciales de enraizadores con AIB, que se utilizan con esta finalidad. En las estacas del Sitio 1, se utilizó el enraizador comercial Raizone-Plus®, el cual se ha aplicado en la propagación vegetativa de especies maderables (Flores, 2006 citado por Hernández, 2014). Para las estacas del Sitio 2, se aplicó Radix10000®, el cual se ha utilizado en tratamientos para enraizado de estacas, como en cirimo *Tilia mexicana* (Muñoz-Flores *et al.*, 2011).

De acuerdo a lo señalado por Badilla (2005), uno de los principales factores para lograr un adecuado enraizado de estacas, es mantener una humedad relativa alta ($\geq 80-90\%$) durante el cultivo, por lo que se requieren de óptimas condiciones durante el enraizado, donde es esencial la selección del sustrato y el tipo de la unidad experimental. Es por ello, que en esta investigación, para el cultivo de estacas del Sitio 1, se trabajó con contenedores de 5 L, conteniendo una mezcla de turba-agrolita-tierra de hoja (1:1:1 v/v), el cual resultó ser más eficiente en las respuestas de supervivencia, enraizado y formación de brotes (Figuras 15A y 15B), debido a que se lograron mejores condiciones de humedad relativa. Por el contrario, con el sistema de propagación de estacas que se utilizó para el material del Sitio 2, que consistió en rizotrones de PVC de 1 L con turba-agrolita (1:1 v/v), el factor humedad pudo ser el que influyó en la escasa respuesta.

Debido a que las estacas del Sitio 2 no fueron cultivadas en el sistema de contenedores, además del factor de humedad relativa, la edad del árbol pudo ser otro factor determinante sobre el nulo enraizado. Boutherin y Bron (2004), citado por Gárate (2010), establecieron que las estacas obtenidas de árboles más jóvenes enraízan con mayor facilidad que las procedentes de árboles más viejos (Leakey, 1991; Miguelez-Sierra, 2016; Comunicación personal). El árbol donante de estacas del Sitio 2, fue un individuo con fuste de ≈ 55 cm diámetro y entre 10 a 12 m de altura, considerado por estas características un individuo de mayor edad, comparándolo con el árbol donante del Sitio 1, cuyo fuste midió ≈ 20 cm de diámetro y entre 4 y 5 m de altura.

Como ya se ha mencionado, los mejores resultados de supervivencia, enraizado y formación de brotes, se observaron en las estacas del Sitio 1. En este sentido, como lo señala Moreno (2005), altos porcentajes de supervivencia ($\geq 90\%$) fueron observados en estacas de *Trichanthera gigantea* con tres o cuatro yemas, donde la época de siembra coincidió con la temporada de lluvias. El enraizado de estacas de *A. negundo* del Sitio 1, también coincidió con la época de lluvias (meses de Junio-Julio de 2016), por lo que dichas condiciones pudieron influir en estos resultados.

En general, para más de 30 diferentes especies del género *Acer* se ha reportado un buen enraizado (Dirr y Heuser Jr., 2006), en el maple de azúcar (*Acer saccharum* Marsh.) se ha obtenido un alto porcentaje de enraizado ($\geq 75\%$) después de 12 semanas de cultivo (Tousignant *et al.*, 2003). Sin embargo, se destaca que no hay respuesta para el enraizado de estacas de *A. negundo* (Cuadro 3), por lo que los resultados de la presente investigación son un primer reporte de éxito en el enraizado de estacas para este árbol en estudio.

Los resultados obtenidos en el cultivo de estacas de *A. negundo*, muestran que, para obtener una óptima respuesta de enraizado, éstas deben ser colectadas en la época de verano (meses de Junio y Julio), que procedan de árboles jóvenes y cultivarse en un sistema de cultivo con alta humedad relativa.

X. CONCLUSIONES

En este estudio, se estableció el cultivo *in vitro* de yemas de *Acer negundo*, determinando un método óptimo de desinfección (Rutina 4), con el que se obtuvieron los menores índices de oxidación, contaminación y necrosis en yemas procedentes de la zona más irradiada (posición Este, E), mostrando porcentajes altos de supervivencia, tanto en yemas apicales (80%) como en axilares (100%), a los 30 días del cultivo.

La supervivencia de los explantes fue dependiente de la etapa de colecta, ya que en las correspondientes a otoño-invierno (Septiembre-Octubre y Diciembre-Enero), no sobrevivieron después de los 60 días de cultivo. Los explantes de las colectas de primavera-verano (Marzo-Abril y Junio-Julio) sobrevivieron más de 90 días, mostrando los mayores porcentajes de supervivencia las provenientes de la colecta de Junio-Julio ($\geq 70\%$).

Los más altos porcentajes de brotación de *A. negundo*, se presentaron a los 60 días de cultivo, tanto en yemas apicales ($\geq 60\%$) como en yemas axilares ($\geq 70\%$), procedentes de la colecta de los meses Junio-Julio, cultivadas en los diferentes tratamientos de ANA/BA.

El enraizado (90%) y formación de brotes (2.3 brotes/estaca), se logró con las estacas de *A. negundo* procedentes del árbol del Sitio 1; colectadas en la época de verano (meses de Junio y Julio), cultivadas en un sistema de cultivo con alta humedad relativa.

Con la obtención de los cultivos *in vitro* y de estacas de *A. negundo*, se establecieron las condiciones para su propagación.

XI. PERSPECTIVAS

1. Determinar las condiciones óptimas de la brotación múltiple y el enraizado *in vitro* de *A. negundo*.
2. Evaluar la supervivencia, el crecimiento y el desarrollo de plantas micropropagadas de *A. negundo*, durante la etapa de trasplante y aclimatación, y en condiciones de cultivo en invernadero.
3. Realizar en forma masiva la propagación por estaca con las condiciones establecidas y realizar estudios para su cultivo en invernadero y campo.

XII. LITERATURA CITADA

- Abd Alhady, M. R. A. A. A., Abd Alla, M. M., Hegazi, El- nomeim Hegazi, G. A., Farid Gabr, M. 2010. Rapid propagation of *Periploca angustifolia* Labill. by tissue culture. International Journal of Plant Developmental Biology. Global Science Books 4 (1): 15-18 p.
- Abdelnour, A., Muñoz, A. 2005. Micropropagación de Teca (*Tectona grandis* L. f) Kurú: Revista Forestal (Costa Rica) 2 (5): 1-11 p.
- Adema, M. 2015. ¿Por dónde empezamos? Establecimiento de cultivos *in vitro*-Plantas madre. Explantes. 81-91. *En* Plantas de Probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Sandra Sharry, Marina Adema y Walter Abedini (coordinadores). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de la Plata. Editorial de la Universidad de la Plata. 241 p.
- Aguilar-Rodríguez, S., Castro- Plata B. J. 2006. Anatomía de la Madera de doce especies del bosque mesófilo de montaña del Estado de México. Madera y Bosques. 12 (1): 95-115 p.
- Ahuja, M. 1997. Biotechnology in forestry: expectations and challenges. *In*: Perspective of Forest Genetic Tree Breeding on a Changing World, IUFRO World Series. Vienna, Austria. 6, 45-55 p.
- Alden, H. A. 1995. Hardwoods of North America. United States Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison, WI. 136 p.
- Avendaño Reyes, S., Acosta Rosado I. 2000. Plantas utilizadas como cercas vivas en el estado de Veracruz. Madera y Bosques 6 (1): 55-71 p.
- Ayma, R. A. I., Soto, R. G. 2015. Propagación de *Podocarpus glomeratus*: efecto del tamaño de esquejes y su profundidad de siembra en el enraizamiento y crecimiento. Boletín Proyecto y Manejo y Restauración de Bosques de Independencia. 1-5 p.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Revisión Bibliográfica. Agronomía Mesoamericana 20 (1): 153-175 p.
- Badilla, V. Y., Murillo, G. O. 2005. Enraizamiento de estacas de especies forestales. Kurú: Revista Forestal (Costa Rica) 2 (6): 1-6 p.
- Baldi, A., Bisaria V. S., Srivastava A. K. 2008. Biotechnological approaches for the production of some promising plant-based chemotherapeutics, Chapter 7.

In Medicinal Plant Biotechnology. From Basic Research to Industrial Applications. Edited by Oliver Kayser and Wim J. Quax. 115-117 p.

Barañaño, J. J., Peñón E. A., Craig E., Cucciuffo E., De Falco. 2008. Manual para identificación de maderas, con aumentos hasta 10X. Universidad Nacional de Luján Departamento de Tecnología. Producción Vegetal IV. Dasonomía. 58 p.

Boeri, P. 2015. ¿Cómo se nutren las plantas de probeta? Medios de cultivo-Reguladores de crecimiento. 46-72. *En* Plantas de Probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Sandra Sharry, Marina Adema y Walter Abedini (coordinadores). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de la Plata. Editorial de la Universidad de la Plata. 241 p.

Brassard, N., Richer C., Tousignat D., Rioux J. A. 2003. Multiplication Végétative de l' *Acer saccharum*: contribution á la micropropagation. *Can. J. For. Res.* 33, 682-690 p.

Briones, V. 2015. Micropropagación: la técnica de “fotocopiado” de plantas. Micropropagación-Etapas. Establecimiento de plantas a condiciones de campo. 112-120. *En* Plantas de Probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Sandra Sharry, Marina Adema y Walter Abedini (coordinadores). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de la Plata. Editorial de la Universidad de la Plata. 241 p.

Calderón de Rzedowski, G. 2001. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 94. Familia Aceraceae. Instituto de Ecología A. C. Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán, México. 1-7 p.

Carranza. P. M., Reyes, M. H., Mora, S. W., Cevallos, F. O., Escobar, T. A., Cadme, A. M., Nieto, R. J., Morante, C. J. 2013. Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba). *Ciencia y Tecnología* 6 (2): 1-8 p.

Coello, J., Piqué, M., Beltrán, M. 2015. Las claras en plantaciones para producción de madera de calidad. Centre Tecnològic Forestal de Catalunya para Bosques Naturales, S. A. Solsona, Lleida. 11 p.

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

Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plantas: Columbia University Press, New York.

- Dalal, M., Sahni, C., Khan, A., Surinder, K., Kumar, S. 1999. Effect of explant source and stock plant treatment on pre-existing total phenols and culture initiation of grapevine *in vitro*. Applied Biological Research 1, 95-98 p.
- Das, T., Mitra, G. 1990. Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 22, 95-103 p.
- Das Prajapati, N., Kumar U. 2003. Agro's Dictionary of Medicinal Plants. Agrobios (India) 16 p.
- Davel, M. M., Jovanovski, A., Mohr Bell, D. 2005. Densidad básica de la madera de pino oregón y su relación con las condiciones de crecimiento en la Patagonia Andina Argentina. Bosque 26 (3): 55-62 p.
- Dirr, Michael A. y Heuser, Jr. Charles W. 2006. The reference manual of woody plant propagation. From seed to tissue culture. Second edition. Timber Press. Portland, USA. 410 p.
- Dodds, J.H. y Roberts L.W. 1995. Experiments in plant tissue culture. Cambridge Univ. Press, Third Edition. Cambridge, U. S. A. 261 p.
- Donoso I. 1998. Desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* de bayas de vid. Memoria Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Escuela de Agronomía, Universidad de Chile. 73 p.
- Đurcovič, J., Mišalová, A. 2008. Micropropagation of temperate noble hardwoods: An overview. Functional Plant Science and Biotechnology. Global Science Books. 2 (1): 1-19 p.
- Flores, O. M. H. y Lindig- Cisneros R. 2005. La lista de nombres vulgares y botánicos de árboles y arbustos propicios para repoblar los bosques de la República de Fernando Altamirano y José Ramírez a más de 110 años de su publicación. Revista Mexicana de Biodiversidad. 76, 11-35 p.
- Flores, R.A. 2006. Propagación por acodo aéreo de *Magnolia grandiflora* L. Tesis de Ingeniería en Restauración Forestal. Chapingo, Texcoco Edo. De México. 59 p.
- Galindo Bianconi, A. S., Victoria Uribe R. 2012. La vegetación como parte de la sustentabilidad urbana: beneficios, problemáticas y soluciones, para el Valle de Toluca. Quivera. 14 (1): 98-108 p.
- Galvez Guerra, D., Cabrera Jova, M., Boevides, Y., Robaina Jiménez, A., Rodríguez, S., Rodríguez, D. 2013. Influencia de reguladores del crecimiento y el estado físico del medio del cultivo en la multiplicación *in vitro* de *Colocasia esculenta* clon "INIVIT MC2001". Biotecnología Vegetal. 13 (4): 225-229 p.

- Gárate, Díaz H. M. 2010. Técnicas de propagación por estacas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Ucayali. Ucayali, Perú
- Garriaga-Caraballo, M., González-Oramas G., Alemán-García S., Abreu-Cruz E., Quiroz-Bravo K., Caligari D. S. P., García-González R. 2010. Management of auxin-cytocinin interactions to improve micropropagation protocol of henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Chilean Journal of Agricultural Research. 70 (4): 545-551 p.
- González, M. E., Hernández, M. M., Mazorra, L. M., Rodríguez, Y., Cabrera, M. 2005. Influencia de la época del año y el genotipo en la respuesta morfogénica y bioquímica de explantes foliares de *Coffea canephora* P. var. Robusta empleados para la formación de callos. Biotecnología Vegetal 5 (2): 121-127 p.
- González Vicente, C. E. 1981. El papel de la reforestación en la protección y mejoramiento del ambiente de las zonas urbanas. Rev. Ciencia Forestal 32, 54-64 p.
- Gutiérrez Caro C., Ríos, D., Sabja, A. M., Sánchez, M. E. 2005. Clonación de Raulí: Estado actual y perspectivas. Editores: Braulio Gutiérrez, Oriana Ortiz y María Paz Molina. CEFOR INFOR UACH. 140 p.
- Hartman, H.T y Kester D.E. 1985. Propagación de Plantas: principios y prácticas. C.E.C.S.A. Quinta Reimpresión. México. D. F. México. 795 p.
- Hernández, Cuevas J. A. Del C. 2011. Germinación de especies arbóreas de bosque mesófilo de montaña y evaluación del crecimiento inicial de *Acer negundo* L. en tres ambientes lumínicos. Tesis Licenciatura Facultad de Biología Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 42 p.
- Hernández, García A. 2014. Propagación *in vitro* SW *Dalbergia congestiflora* (Campincerán) a partir de estacas cultivadas en invernadero. Tesis Maestría FITECMA-UMSNH. Michoacán, México. 83 p.
- Hernández, Y., González, M. E. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. Revisión Bibliográfica. Cultivos Tropicales. 31 (4): 1-19 p.
- <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos celulares II Euge>.
- Jácome, Tabango A. S. 2011. Micropropagación *in vitro* de la especie endémica: Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*), para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción. Tesis. Sangolquí, Ecuador. 151 p.

- Jiménez, L., Rodríguez A. y Ferrer J. L. 2006. Caracterización química de materias primas alternativas para pastas celulósicas. *Industria Papelera* 86-94 p.
- Jordán, M., J. Velozo, and A. Sabja. 1996. Organogenesis *in vitro* of *Nothofagus alpina* (P.et E.) Oerst., (Fagaceae). *Plant Cell Report* 15, 795-798 p.
- Kanungo, S., Pradhan, Ch., Lata Sahoo, S., Kanta Sahu, R. 2012. Role of auxins in the *in vitro* rooting and micropropagation of *Holarrhena antidysenterica* Wall., a woody aromatic medicinal plant , through nodal explants from mature trees. *Journal of Medicinal Plant Research*. 6 (31): 4660-4666 p.
- Lamarque, L. J., Lortie C. J., Porté A. J., Delson S. 2015. Genetic differentiation and phenotypic plasticity in life- history traits between native and introduced populations of invasive maple trees. *Biol Invasions* 17, 1109-1122 p.
- Leakey, B.; Mesén, F. 1991. Métodos de propagación vegetativa en árboles tropicales: enraizamiento de estacas suculentas. Capítulo 10. In: Manual sobre Mejoramiento Genético Forestal con Referencia Especial a América Central. Cornelius, J.P.; Mesén, F.; Corea, E. (eds.). Proyecto Mejoramiento Genético Forestal, CATIE, Turrialba, Costa Rica: 135-153 p.
- León, S., Arenas, L., Vilorio, Z. 1997. Efecto de la exposición solar de las plantas donantes en la iniciación del cultivo *in vitro* de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 14, 43-55 p.
- López-Sánchez, E., Musálem, M. A. 2007. Sistemas agroforestales con cedro rojo, cedro nogal y primavera, una alternativa para el desarrollo de plantaciones forestales comerciales en los Tuxtlas, Veracruz, México. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*.13 (1): 59-66 p.
- Loyola-Vargas, V. M., Vázquez-Flota, F. 2006. *Methods in Molecular Biology™. Plant Cell Culture Protocols. Second Edition*. Edited by: Victor M. Loyola-Vargas and Felipe Vázquez-Flota. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Yucatán, México. 411p.
- MacRae, S., and P. Cotterill. 1997. Macropropagation and micropropagation of *E. globulus*. Means of capturing genetic gain. *Proceedings of the IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalyptus v2: Biotechnology applied to genetic improvement of tree species*. Salvador, Brasil. 102-110 p.
- Marks, T., Simpson, E. 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field- grown stock plants to darkness or low levels of irradiance. *Journal of Horticultural Science* 65 103-111 p.

- Martínez Pastur, G., y M. Arena. 1995. Desarrollo preliminar de protocolos de cultivo *in vitro* para las especies de *Nothofagus caducifolios* patagónicos. Actas IV Jornadas Forestales Patagónicas. San Martín de los Andes. Argentina. 127-136 p.
- Martínez Pastur, G., and M. Arena. 1996. *In vitro* propagation of *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. Phytion 58:1-7 p.
- Martínez Pastur, G., M. Arena, y O. Caso. 1997. Micropropagación de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et End.) Krasser. Bosque 18 (2): 43-50 p.
- Medina Basurto, J. de J. 2015. Producción de Frutales y Ornamentales. Antología. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Zitácuaro, Michoacán, México. 46 p.
- Medinilla Sánchez, O. E. 2006. Establecimiento, propagación y conservación *in vitro* de *Acer skutchii* especie endémica y en peligro de extinción en Guatemala. Consejo Nacional de Ciencia y tecnología -CONCYT- Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología -SENACYT- Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología -FONACYT- Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala –FAUSAC- Guatemala 41 p.
- Méndez, E. 2004. Identificación de plantas masculinas y femeninas de *Acer negundo* L. (Aceraceae) en arboledas urbanas Mendoza, Argentina. Comunicación tecnológica. Rev. FCA UNCuyo Tomo XXXVI. 1. 17-20 p.
- Morales, V., O. J., 2006. Propagación por estacas del portainjerto de manzano robusta. Tesis. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 58 p.
- Moreno, F. y Guerrero, A. 2005. Evaluación de cuatro métodos de propagación en campo de *Trichanthera gigantea*. Rev.Fac.Agron. (LUZ). 22, 13-21 p.
- Morse A. C., Blanchette R. A. 2002. Etiology of red stain in boxelder. Plant Management. Network. 1-9 p.
- Morselli, M. f., 1989. Maple (*Acer spp.*) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 5. Trees II. 246-286 p.
- Muñoz-Flores, J., Orozco G.G., García Magaña J., Coria A.V.M., Salgado G.R. y Santiago S.M.R. 2011. Épocas de colecta y tratamientos para enraizamiento de estacas de cirimo *Tilia mexicana* Schlecht. (Tiliaceae). Revista Mexicana Ciencias Forestales 2 (3): 13-22 p.
- Nebel, J. P., Porcile J. F. 2006. La contaminación del bosque nativo por especies arbóreas y arbustivas exóticas. Dirección General Forestal. Uruguay 34 p.

- Núñez Sosa, D. B. 2007. Propagación de plantas por vía agámica. Departamento de Agricultura. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. 1-19 p.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*. 15, 473-497 p.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Plant Physiol*. 25, 135-166 p.
- Olmos, S., Luciani, G., Galdeano, E. 2010. Micropropagación. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. 354-362. *En: Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. ArgenBio Consejo Argentino para la Información y el desarrollo de la Biotecnología. Editores: Dra. Gabriela Levitus, Dra. Viviana Echenique, Dra. Clara Rubistein, Dr. Esteban Hopp, Ing. Agr. Luis Mroginski. 650 p.
- Omogbadegun, Z. O., 2013. Medicinal plants-based foods for breast cancer treatment: An ethnobotanical survey and digitization. *International Journal of Medicinal Plants and Alternative Medicine*. 1 (8): 137-163 p.
- Ortuño, M. A. 2006. Jardines históricos españoles: El parque de la Constitución de Yecla. *Bouteloua*. 1, 76-89 p.
- Özgen, U., Kaya Y., Houghton P. 2012. Folks medicines in the villages of Ilica District (Erzurum, Turkey). *Turk J Biol*. 36, 93-106 p.
- Pérez-Molphe, B.E.M., Ramírez M.R., Núñez P.H.G. y Ochoa A. N. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 1a Edición, Aguascalientes, Ags. 51-69 p.
- Peters, R., 2000. *Wood Work'ers. Guide to Wood*. Publishing Co., Inc. New York. 192 p.
- Pitekelabou, R. 2015. *In vitro* Micropropagation of *Nauclea diderrichii* (De Wild & T. Durand) Merrill: Effect of nodes position on plantlets growth and rooting. *European Scientific Journal*. 11 (21): 377-385 p.
- Preece, J. E., Huetteman, C. A., Ashby, W. C., Roth, P. L. 1991. Micro- and cutting propagation of Silver Maple. I. Results with adult and juvenile propagules. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*. 116 (1): 142-148 p.
- Quinapallo, Paucar T. E., Velez, Peña N. M. 2013. Propagación sexual y asexual de cuatro especies forestales promisorias del bosque seco del Cantón Zapotillo Provincia de Loja. Tesis. Universidad Nacional de Loja. Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables. Loja, Ecuador. 173 p.

- Ramos, Amaya J. E. 2012. Avances de la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas. Bogotá, Colombia. 83 p.
- Reed, R. M. 2010. Selecting and propagating clones of Bigtooth maple (*Acer grandidentatum* Nutt.). Thesis of Master of Science. Utah State University. Logan, Utah. 110 p.
- Rivera Núñez, D., Alcaraz Ariza F. J., Verde López A., Fajardo Rodríguez J. Obón de Castro C. 2008. Las plantas en la cultura popular. Enciclopedia divulgativa de la historia natural de Jumilla-Yecla. Vol. 9. 272 p.
- Rivero, G., Ramírez, M., León, S. 2001. Tipo de explante en el establecimiento *in vitro* de guanábano (*Annona muricata* L.), Rev.Fac. Agron. (LUZ). 18, 258-265 p
- Rojas González, S., García Lozano, J., Alarcón Rojas, M. 2004. Propagación asexual de plantas. Conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas. CORPOICA. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. PRONATTA. Produmedios Editores. Bogotá, Colombia. 56 p.
- Rovină, E. A., Călinescu M., Plopa C., Isac V. 2010. *In vitro* regeneration capacity of the ornamental varieties related to the cultural media. Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology Romana. 14 (1): 13-18 p.
- Rueda Sandoval, L. E., 2013. Dosis de ácido indolbutírico en dos tipos de sustrato para la propagación vegetativa de estaquillas de canela (*Cinnamomun sp.*) en camaras de sub irrigación en la región San Martín – Perú. Tesis. Tarapoto, Perú. 75 p.
- Ruíz-Jiménez, C. A., Téllez-Valdés O., Luna-Vega I. 2012. Clasificación de los bosques mesófilos de montaña de México: afinidades de la flora. Revista Mexicana de Biodiversidad. 83, 1110-1144 p.
- Salgado-Garciglia, R. 2013. La propagación de plantas *in vitro*, un éxito biotecnológico. Saber más. Revista de Divulgación de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Año 2/ Julio-Agosto/ 10, 21-24 p.
- Salisbury, F. y Ross C. 1994. Fisiología vegetal. Cuarta edición. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. México. D.F. 759 p.
- Sánchez, O. 2000. Micropropagación de algunas leñosas nativas. Editorial Trama. Universidad de Concepción, Chile. 322 p.
- Sántiz, M. E., 2005. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre la morfogénesis *in vitro* en yemas axilares de tres diferentes posiciones de *Taxodium mucronatum* Ten. (Ahuehuete). Tesis de Licenciatura UMSNH. México 59 p.

- SEMARNAT, 2010. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental, especies nativas de México de flora y fauna silvestres, categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Diario Oficial de la Federación. México. 1-80 p.
- Segretín, M. A. 2006. Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). ArgenBio. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. 6 p.
- Sharma, H., Vashistha, B. D. 2015. Plant tissue culture: a biological tool for solving the problema of propagation of madicinally important woody plants- A review. International Journal of Advanced Research. 3 (2): 402-411 p.
- Silva-Guzmán, J. A., Fuentes-Talavera F. J., Rodríguez-Anda R., Torres-Andrade P. A., Lomelí-Ramírez M. G., Ramos-Quirarte J., Waitkus C., Richter H. G. 2011. Fichas de propiedades tecnológicas y usos de maderas nativas de México e importadas. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. México.
- SIRE. 2005. Paquetes tecnológicos *Acer negundo* L., CONABIO-PRONARE http://beta.semarnap.gob.mx/pfnm/Acer_negundo.html
- Smalley, T. J., Dirr, M. A. 1987. Effect of cutting size on rooting and subsequent growth of *Acer rubrum* "Red Sunset" cuttings. J. Environ. Hort. 5 (3): 122-124 p.
- Smith, D. 1997. The role of *in vitro* methods in pine plantation establishment: the lesson from New Zealand. Plant Tissue Culture and Biotechnol 3 (2): 63 -73 p.
- Surga, J. G., y Guevara, Y. 1994. Pruebas de desinfección para controlar la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de ápices caulinares de banano (*Musa AAA*). Fitopatología Venezolana. 7 (1): 14-17 p.
- Thompson, D., Harrington, F., Douglas, G., Hennerty, M. J., Nakhshab, N., Long, R. 2001. Vegetative propagation techniques for oak, ash, sycamore and spruce. COFORD, Dublin. 31 p.
- Tousignant, D., Richer, C., Rioux, J.-A., Brassard, N. and Mottard, J.-P. 2003. Vegetative propagation of sugar maple: Relating stem water content and terminal bud developmental stage to adventitious rooting of stem cuttings. Can. J. Plant Sci. 83, 859–867 p.

- Traore, A., Xing, Z., Bonser, A., Carlson, J. 2005. Optimizing a protocol for sterilization and *in vitro* establishment of vegetative buds from mature Douglas fir trees. *HortScience* 40 (5): 1464-1468 p.
- Łucsaj, Ł., Bilek M., Stawarczyk K. 2014. Sugar content in the sap of birches, hornbeams and maples in southeastern Poland. *Cent. Eur. J. Biol.* 9 (4): 410-416 p.
- Uribe, M. E., Delaveau, C., Garcés, M., Escobar, R. 2008. Efecto de Asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis coralline*, a partir de segmentos nodales. *Bosque* 29 (1): 58-64 p.
- Villalobos, A. V. M., Thorpe, T. A. 1983. Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados (Capítulo 6). *Cultivo de tejidos en la agricultura*. CONACYT. México. 127-141 p.
- Villareal, B. 2015. ¿Cómo se forman los nuevos órganos *in vitro*? Morfogénesis *in vitro*. Organogénesis. Embriogénesis somática. 92-101. *En Plantas de Probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Sandra Sharry, Marina Adema y Walter Abedini (coordinadores). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de la Plata. Editorial de la Universidad de la Plata. 241 p.
- Vitasse, Y., Porté A. J., Kremer A., Michalet, R., Delzon S. 2009. Responses of canopy duration to temperature changes in four temperate tree species: relative contributions of spring and autumn leaf phenology. *Oecologia*. 1363-1374 p.
- Vogt, C. 1994. Identifying maple trees for syrup production. Minnesota maple series. Minnesota extension service. University of Minnesota. 2 p.
- Way, D. A. 2011. Tree phenology responses to warming: spring forward, fall back? *Tree Physiology*. 31: 469-471 p.
- Wilkins, L. C., Graves, W. R., Townsend, A. M. 1995. Development of plants from single-node cuttings differs among cultivars of Red maple and Freeman maple. *HortScience*. 30 (2): 360-362 p.
- Wood Handbook. Wood as an engineering material. 2010. United States Department of Agricultura. Forest service. Forest products laboratory. General technical report FPL-GTR-190. USDA. Centennial edition. Robert J. Ross. Editor. 508 p.
- World Conservation Monitoring Centre. 1998. *Acer negundo ssp. mexicanum*. *The IUCN Red List of Threatened Species 1998*: e.T32480A9703191. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1998.RLTS.T32480A9703191>.

Zimmerman, J. L. 1993. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell*. 5. 1411-1423 p.

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