

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Producción Agrícola y Animal
Licenciatura en Agronomía

Proyecto de Servicio Social Legal

“Aislamiento y rescate de embriones de *Pinus patula*”

Presentador de Servicio Social
Hernández Hernández Marily
Matrícula 2143060237

Asesores:

Interno: Dr. Antonio Flores Macías

Número económico: 13174

Externo: Dr. Carlos Román Castillo Martínez

Cédula profesional: 2162857

Lugar de realización: Laboratorio de Biotecnología. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales. Fecha de inicio y terminación: 04 de mayo de 2018 a 04 de noviembre de 2018.

Índice

I. RESUMEN	3
II. INTRODUCCIÓN	4
III. MARCO TEÓRICO	5
3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE	5
3.1.1 Clasificación taxonómica	5
3.1.2 Sinonimia.....	5
3.1.3 Nombres comunes	6
3.1.4 Descripción morfológica (Ospina <i>et al.</i> , 2011; INAB, 2017).....	6
3.1.5 Distribución geográfica y ecología.....	6
3.1.6 Usos	7
3.2 EL CULTIVO <i>IN VITRO</i> COMO UNA ALTERNATIVA PARA SILVICULTURA 8	
3.2.1 El cultivo <i>in vitro</i> de especies forestales	8
3.2.2 Ventajas del cultivo <i>in vitro</i> para el sector forestal	8
3.2.3 Tipos de explante	8
3.2.4 El aislamiento de embriones e importancia de esta técnica.....	9
IV. OBJETIVOS	9
4.1 Objetivo general.....	9
4.2 Objetivos particulares	9
V. MÉTODOS	10
5.1 Área de estudio	10
5.2 Diseño experimental	10
5.3 Origen de material vegetal	10
5.4 Procesamiento de las muestras	10
5.5 Establecimiento de embriones	11
5.6 Monitoreo	11
5.7 Análisis estadístico	11
VI. ACTIVIDADES REALIZADAS	12
VII. METAS	12
VIII. RESULTADOS	12
6.1 Trens de desinfección	12
6.2 Tasa germinativa	13
6.3 Crecimiento en tallo y raíz	14
IX. Conclusiones	17
X. Recomendaciones	17
XI. LITERATURA CITADA	18

I. RESUMEN

Pinus patula Schl. & Cham es una especie forestal de mayor distribución e interés económico en la industria maderera y papelera, debido a su rápido crecimiento y alta calidad de su madera. Cabe señalar que, las semillas de estas coníferas son de gran importancia al proceder de fenotipos deseables o de individuos genéticamente modificados, por tal motivo el objetivo de este trabajo fue probar trenes de desinfección que beneficien una germinación *in vitro* libre de patógenos. Además, es una especie con germinación escasa y lenta, principal causa que perjudica el proceso de regeneración de bosques, por ello se han buscado técnicas biotecnológicas alternativas para la propagación de esta especie. Por ello, se realizó una metodología de aislamiento de embriones y se compararon distintos medios de cultivo [CA (2g/L) y DCR (0.57 g/L), MS+DCR, DCR+ 2,4D (1 mg/L) y MS+ 2,4D] en los que se evaluó germinación y crecimiento de tallo y raíz; cabe mencionar que los mejores tratamientos para germinación y crecimiento en tallo con respecto al testigo fueron CA+DCR y MS+DCR. Por otra parte, los tratamientos de trenes de desinfección de la semilla en los que se empleó H₂O₂, Cl y Captan resultaron factibles para ser utilizados en esta semilla para cultivo *in-vitro*.

II. INTRODUCCIÓN

En México, las coníferas son de gran importancia ecológica, económica y social. Es importante destacar que en el país prevalece gran diversidad de *Pinus* como es el caso de pinos piñoneros, pinos alpinos (*P. hartwegii* y *P. culminicola*) y otros ubicados principalmente en zonas tropicales como *P. caribea* y *P. oocarpa*. En general, las especies de pinos influyen en los procesos funcionales del ecosistema como los ciclos biogeoquímicos, hidrológicos y los regímenes de fuego, por otra parte, fungen como hábitat y fuente de alimento para la fauna silvestre. Poseen alto valor económico, puesto que son fuente de madera, leña, pulpa, resinas, semillas comestibles y otros productos. Además, otorgan importantes beneficios ambientales e influyen en el clima regional (Sánchez, 2008). Sin embargo, la deforestación ha provocado la erosión genética de las especies, disminución de mantos acuíferos, cambios de clima, pérdidas y erosión de suelo, extinción y migración de la fauna y otros cambios ecológicos y sociales (Muñoz *et al.*, 2010).

Pinus patula es una de las especies mayormente afectada por la cultura silvícola dedicada a la extracción de árboles con características fenotípicas como rectitud de fuste, poda natural y aquellos árboles libres de patógenos (Mendizábal, 2000). Cabe señalar, que la mayor parte de los estudios realizados a esta especie consisten en la evaluación de características físicas y anatómicas, al crecimiento y rendimiento, estudios biosistemáticos, entre otros, sin embargo, nuestro país, carece de estudios enfocados en la variación, mejoramiento genético, conservación y micropropagación de esta especie (Cruz, 2007).

En la actualidad los investigadores han recurrido a la micropropagación *in vitro* de especies forestales, ya que contribuyen a la conservación de diversidad biológica y que facilitan la reproducción eficiente de plantas (Domínguez, 2011).

Collado *et al.* (2006) realizaron aislamiento de embriones inmaduros de *Swetenia macropylla* King, colocaron el tejido en medio 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) a tres concentraciones distintas, en donde obtuvieron más del 90% de embriones somáticos en etapa cotiledonal. Por otra parte, Bonilla (2014) realizó extracción de embriones de *Erythrina edulis* M, los cuales fueron incubados en medio básico Murashine & Skoog (MS) + Ácido naftalenacético (ANA), es importante mencionar que este estudio se centró en la evaluación de microinjertos. Por los motivos

ntes mencionados la presente investigación tiene como objetivo: Evaluar el crecimiento de embriones aislados *Pinus patula in vitro* en diferentes medios de cultivo.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE

3.1.1 Clasificación taxonómica

De acuerdo con Ramírez (2000) y Perry (1991) citado en Peralta (2007) la clasificación taxonómica de *Pinus patula* Schl. & Cham es la siguiente:

Reino: Vegetal

División: Spermatophita

Orden: Coníferas

Familia: Pinacea

Género: *Pinus*

Subgénero: Diploxilon o pinos duros

Sección: Serotinae

Subsección: Patula

Especie: *Pinus patula*
Schiede ex Schlechtendal &
Chamisso var. *patula*

3.1.2 Sinonimia

En su área de distribución natural y Latinoamérica la especie es conocida por diversos nombres científicos de los cuales se pueden mencionar: *Pinus besseriana* Roetzl, *Pinus Calocote* Roetzl. ex Gordon., *Pinus jalocote* Roetzl. ex Gordon, *Pinus microcarpa* Roetzl, *Pinus mulleriana* Roetzl, *Pinus Patula* var. *Stricta* Benth. Ex Endl (Escobar,2017), *Pinus subpatula* Roetzl. ex Gord., *Pinus oocarpa* var. *Ochoterenai* Martínez, *Pinus patula* var. *longipedunculata*, entre otros (Gillespie, 1992).

3.1.3 Nombres comunes

En México este árbol es conocido como pino chino, pino llorón mexicano, pino colorado, pino pátula, ocote macho, pino xalocote, pino escobetón, juncia, palo otomite, albacarrote amarillo, entre otros (Ospina *et al.*, 2011; Escobar, 2017).

3.1.4 Descripción morfológica (Ospina *et al.*, 2011; INAB, 2017)

Porte del árbol y corteza: es un árbol que puede alcanzar una altura de 30-35 m y un diámetro de hasta 40 y 120 m. El tronco es cilíndrico y recto en su estado joven, además presenta una corteza liza y rojiza, posteriormente se torna color marrón, áspera y escamosa. La distribución de las ramas es desuniforme y por lo general se insertan a un ángulo de 45° en el tronco. La copa es amplia con ramas largas y colgantes. Esta especie posee un sistema radicular pivotante y profundo.

Hojas: son aciculadas y agrupadas en fascículos de 3 o 4 agujas, presentan una longitud entre 15 y 30 cm, de color verde-azulado con bordes ligeramente aserrados, además, se caracterizan por ser más gruesas en comparación con otras especies de pino. Las vainas de las acículas son de color grisáceo y las yemas terminales de color amarillo.

Flores: cada árbol posee estróbilos unisexuales; las inflorescencias femeninas son de color púrpura con pequeñas espinas, se encuentran laterales en racimos de máximo 8 escamas, mientras que las inflorescencias masculinas son de color verde a temprana etapa fenológica y amarillas al culminar su maduración, se ubican alrededor de brotes nuevos en la parte terminal de las ramas.

Semillas: son casi triangulares, van desde color café a negro, miden de 3 a 5 mm de longitud, se encuentran cubiertas por un ala que mide 2,0 cm de largo y 1,0 cm de ancho.

3.1.5 Distribución geográfica y ecología

México cuenta con gran diversidad de bosques compuestos principalmente de especies de pinos y encinos (Viveros-Viveros *et al.*, 2013). Algunos de los que destacan son “Ocote blanco (*Pinus montezumae*), Ocote chino (*Pinus oocarpa*), Ocote pardo (*Pinus hartwegii*), Pino cedrón (*Pinus pringlei*), Acahuite (*Pinus ayacahuite*), Pino chimonque (*Pinus leiophylla*), Pino chino (*Pinus teocote*), Pino lacio (*Pinus pseudostrobus*), hortiguillo (*Pinus lawsoni*), Pino loco (*Pinus cembroides*) y Ocote colorado (*Pinus patula*). En algunas regiones crecen también el abeto (*Abies religiosa*), el Ayarín (*Pseudotsuga menziesii*) y varias especies de Tásate (*Juniperus deppeana*, *J. flaccida*, etc.), y los Pinabetes (*Abies duranguensis*, *A. religiosa*)” (Rzedowski, 2006).

El pino colorado, así como otras poblaciones de coníferas son capaces de adaptarse a diversas condiciones ambientales y altitudes, sin embargo, el potencial de crecimiento de este pino se ve afectado por heladas tardías en primavera y heladas tempranas en otoño, cabe señalar que la distribución altitudinal que favorece a esta especie oscila entre 1600 y 3100 m.s.n.m. (Viveros-Viveros *et al.*, 2013).

Estudios reportan que esta especie se distribuye comúnmente en formaciones montañosas, principalmente en los estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz en donde prevalecen las más grandes poblaciones con mejor desarrollo de pinos; por lo general, en estos sitios se definen cuatro climas: semiárido, templado subhúmedo, templado húmedo y subtropical, además se localizan entre los 2200 y 2600 m.s.n.m. (SNIF, s.f; Monroy, 1997).

En nuestro país, las especies coníferas de género *Pinus* se encuentran expuestas a problemas fitosanitarios (plagas y enfermedades), causa primordial por la que especies (112 aproximadamente) se ven afectadas en cantidad, calidad y talla, lo que representa importantes pérdidas en el proceso de producción en viveros, principalmente. Así como también a aquellas especies trasplantadas a cielo abierto y aquellas ubicadas en su hábitat natural (Cibrián, 2017). En general, estas especies son afectadas en toda su estructura desde la raíz hasta el follaje, algunas de las enfermedades que perjudican son *Phythium spp*, *Fusarium spp*, *Alternaria solani*, *Botrytis spp*, *Dothistroma pini*. Por otro lado, las plagas como el gusano de la yema (*Rhyaciona frustana*), *Pentomorus spp*, *Neodiprion spp* *Alebra spp*, *Pemphigus populitransversus*, entre otros. Cabe destacar que, existen agentes abióticos que provocan efectos contraproducentes en el desarrollo de pinos como el estrés hídrico, viento, heladas, granizo, rayos, desbalance de minerales, contaminación industrial y herbicidas (Gutiérrez, 2005). Estudios recomiendan aplicaciones químicas preventivas, sin embargo, estas no se descartan para cuando las plantaciones se ven perjudicadas, además, se han implementado otros métodos como el control biológico para el caso de insectos plaga (Cibrián, 2017). Por otra parte, se pretende implementar el cultivo de especies mejoradas genéticamente, así como métodos de propagación por medios vegetativos (Wegier *et al.*, 2013).

3.1.6 Usos

Pinus patula se ha implementado como plantación forestal comercial, dado a la calidad de su madera y al elevado contenido de celulosa que contiene, la cual es empleada en la elaboración de papel (CONANP, s.f). Es importante mencionar que una de las

contribuciones más destacadas de las plantaciones de esta especie ha sido para la protección de cuencas hidrográficas, en la conservación y recuperación de suelo (Cruz, 2007).

Además, en otros países sus brotes y resina han sido utilizados como medicina alternativa para aliviar catarro y reumatismo (DFM, 2018).

3.2 EL CULTIVO *IN VITRO* COMO UNA ALTERNATIVA PARA SILVICULTURA

3.2.1 El cultivo *in vitro* de especies forestales

La propagación *in vitro* emplea el principio de totipotencialidad que tienen las células vegetales, proceso que permite regenerar un nuevo individuo biológico a partir de un órgano, es decir, la capacidad que tienen las células meristemáticas para ser diferenciadas y cumplir una función específica dentro del organismo que forman parte. Este método también conocido como propagación clonal, utiliza las condiciones óptimas y características fenotípicas estables para maximizar el desarrollo de la especie (Alcántara *et al.*, 2017; Wegier *et al.*, 2013).

Estudios dieron a conocer que el uso de esta técnica ha aumentado considerablemente, ya que permite en corto tiempo la producción de individuos conocidos como genotipos élite y constituye una herramienta relevante en la multiplicación de especies de interés forestal, con particular énfasis en especies del género *Pinus* (Delgado y Hoyos, 2015).

3.2.2 Ventajas del cultivo *in vitro* para el sector forestal

Esa técnica favorece los procesos de regeneración de las especies, ya que, por sus características como tamaño, producciones irregulares de la semilla, bajo porcentaje de germinación y recalcitrancia, lentitud en el crecimiento y retraso en la floración resulta lento el proceso de multiplicación (Delgado y Hoyos, 2015). Además, beneficia en la diversidad genética para el desarrollo de nuevos cultivos o híbridos con mejores características fenotípicas, entre las que destaca la selección y propagación de individuos resistentes a patógenos o a condiciones ambientales (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010).

3.2.3 Tipos de explante

Consiste en una parte del vegetal como semillas, embriones, hojas, tallos, yemas, raíces, tejidos, células aisladas y protoplastos; el tamaño del explante dependerá del objetivo que se persigue y la especie vegetal utilizada, además, para que este tenga una respuesta

favorable en el medio nutritivo sintético se deben considerar factores como época del año en que se realiza el muestreo del material vegetativo, pretratamientos a los explantes y las condiciones de crecimientos de las plantas donantes de los mismos (Iriondo y Pita, 1998; González, 2007).

3.2.4 El aislamiento de embriones e importancia de esta técnica

Consiste en aislar de las semillas el embrión en estado inmaduro, con el fin de regenerar especies en las que otros explantes no son factibles, cabe destacar que ese estado tiene alto potencial morfogénico y los embriones son más viables dándole las condiciones adecuadas (Gómez-Martínez *et al.*, 2010). Es importante el uso de esta técnica, ya que permite obtener una mayor germinación en comparación con la que deriva de las semillas, también se debe considerar manipular el material vegetal en condiciones asépticas para evitar la proliferación de microorganismos (bacterias-hongos) que provoquen contaminación en el contenedor (Castillo-Martínez *et al.*, 2018). Esta técnica ha sido empleada en el mejoramiento de diversos cultivos como la cebada, frutales y especies arbóreas, sin embargo, se ha inclinado más en la propagación y conservación de especies de importancia forestal, ya que existe mayor respuesta en el crecimiento lento y beneficia la conservación a corto, mediano y largo plazo en comparación con otros explantes y técnicas (Bonilla *et al.*, 2015; Plata-Rueda *et al.*, 2006).

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el crecimiento de embriones aislados *Pinus patula in vitro* en diferentes medios de cultivo.

4.2 Objetivos particulares

Evaluar trenes de desinfección para cultivo *in vitro* de *Pinus patula*

Determinar la tasa de germinación y crecimiento de embriones en medio CA (2g/L) y DCR (0.57 g/L) con respecto al testigo

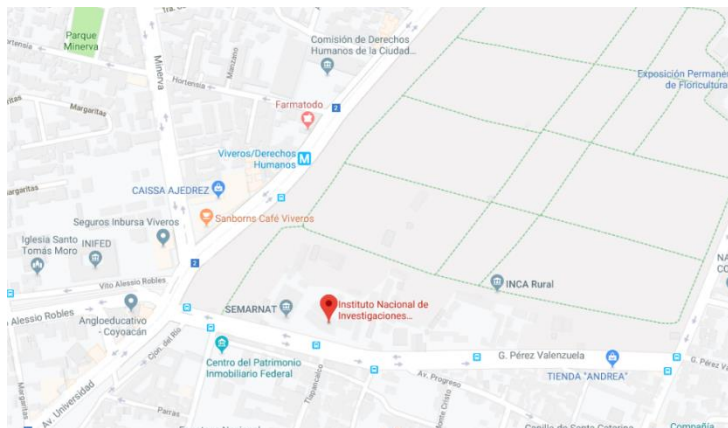
Determinar la tasa de germinación y crecimiento de embriones en medio MS+DCR con respecto al testigo

Cuantificar la tasa de germinación y crecimiento de embriones en medio DCR+ 2,4D (1 mg/L) y MS+ 2,4D en comparación con el testigo

V. MÉTODOS

5.1 Área de estudio

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Vegetal ubicado dentro de las instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Situado en Av. Progreso Núm.5, Colonia Barrio de Santa Catarina, Delegación Coyoacán, Ciudad de México.



5.2 Diseño experimental

El diseño experimental empleado fue completamente al azar. La variable evaluada en los trenes de desinfección fue la presencia de contaminación del embrión por hongo o bacteria y en el caso de la cuantificación de embriones germinados se consideró cantidad de estos con presencia de raíz, y/u hojas verdaderas en cada embrión y longitud de tallo y raíz.

5.3 Origen de material vegetal

El material vegetal utilizado para este proyecto fue proporcionado por el Dr. Carlos Román Castillo Martínez, investigador de INIFAP.

5.4 Procesamiento de las muestras

En esta fase se compararon dos trenes de desinfección con respecto al testigo, para el último antes mencionado las semillas sólo se lavaron en tres ocasiones con agua corriente y jabón.

El primero consistió en lavar con jabón y agua de la llave las semillas en tres ocasiones, posteriormente se colocaron en frascos y dejaron reposar durante 10 minutos en etanol al 70%, cabe señalar que después de cada 5 minutos fueron enjuagadas con agua corriente y se decantó el líquido. Luego se les añadió hipoclorito de sodio al 30% en el cual se dejaron reposar de 10-15 minutos durante dos ocasiones, entre cada lavado se enjuago con agua purificada y se vertió. Finalmente, se dejaron reposar en peróxido de hidrogeno durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas se decantó el peróxido y las semillas se lavaron con agua estéril en tres ocasiones en la campana de flujo laminar, y con

condiciones asépticas se extrajeron los embriones sobre una caja Petri previamente flameada y con ayuda de un bisturí esterilizado (Castillo-Martínez *et al.*, 2018).

En el segundo tren, las semillas fueron lavadas con agua de la llave en tres ocasiones, posteriormente se colocaron en frascos y dejaron reposar durante 30 minutos en captan (2 g/l), luego se continuó el proceso como se menciona anteriormente, cabe resaltar que, en este, el cloro se dejó reposar durante 20 minutos y no se les añadió peróxido de hidrogeno (Castillo-Martínez *et al.*, 2018).

5.5 Establecimiento de embriones

Primero se extirparon los embriones retirando los tejidos periféricos de las semillas de *Pinus patula*, con ayuda de bisturí y pinzas de disección. Para la evaluación de trenes de desinfección, los embriones se introdujeron en tubos con medio sólido (8ml/tubo) de MS (Murashige and Skoog, 1962).

Los embriones utilizados en el conteo de germinación fueron introducidos en tubos con medio líquido y sólido (8 ml/tubo) en el caso de aquellas utilizadas como los testigos y medio sólido para los tratamientos. Los medios utilizados fueron 4.4g de MS (Murashige and Skoog, 1962) (T1), CA (2g/L) +DCR (0.57 g/L) (T2), MS+DCR (T3), DCR+ 2,4D (1 mg/L) (T4) y MS+ 2,4D (T5). Es importante resaltar que en ambos casos sólo sembraron los embriones maduros y sanos.

5.6 Monitoreo

El monitoreo de los tratamientos de germinación de embriones se llevó a cabo transcurrida 1 semana, posteriormente se realizó la evaluación del crecimiento en la 4ta, 8va y 12va semana, en cuanto a los trenes de desinfección se llevó a cabo en la primera, cuarta y octava semana de haber sido colocado el embrión en los tubos.

5.7 Análisis estadístico

La longitud se determinó con el programa IMAGEJ. Luego, el análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico JMP 2008, se realizó la prueba de normalidad, en caso de cumplir con los supuestos se efectuó un análisis de varianza (ANOVA), así como la comparación de medias usando la prueba Mann-Whitney, con un nivel de significancia de $\alpha \leq 0.05$.

VI. ACTIVIDADES REALIZADAS

Primero se elaboró el diseño de tratamientos y enseguida se continuó con la realización de medios de cultivo.

Luego, se llevó a cabo el aislamiento de embriones de semillas de *Pinus patula* y posteriormente se monitorearon los tratamientos al terminar la semana 1 para la evaluación de germinación y transcurridas las semanas 4, 8 y 12 para evaluar el crecimiento de tallo y raíz.

Posteriormente se hizo el análisis de resultados y el protocolo de rescate de embriones.

Finalmente se efectuó el informe final de resultados.

VII. METAS

En base a los objetivos, las metas alcanzadas con este proyecto son:

Contribuir en el conocimiento de métodos de desinfección eficientes para *Pinus patula*.

Aporte de conocimiento científico de la técnica “aislamiento de embriones” para la propagación de *Pinus patula*.

VIII. RESULTADOS

6.1 Trenes de desinfección

En la primera semana se obtuvo 7.692% de contaminación en los tubos, cabe resaltar que fue en T1 (testigo) (Fig.1), por otro lado, en T2 y T3 el 100% de los tubos se encontró libre de patógenos (Fig.2) en todas las evaluaciones realizadas. En un estudio realizado por Flores García y colaboradores (2008), asegura la efectividad que tiene el peróxido de hidrogeno en la esterilización de las semillas forestales, así como las propiedades oxidativas del cloro que fungen como agente desinfectante y que, además, tiene propiedades bactericidas, virucidas y fungicidas. Por otra parte, el etanol, tiene una mayor acción germinicida y contribuye en la desnaturalización de proteínas, volviéndose letal para las bacterias.

Con respecto al tratamiento 2, presentó alta eficiencia debido a que el captan contiene como ingrediente activo la carboxamida, esta interfiere en el proceso de respiración celular en los hongos por lo que impide la germinación de las esporas, dificultando el crecimiento y desarrollo micelial y acompañado de otros desinfectantes como el peróxido, cloro y etanol impiden que los patógenos generen resistencia (Lovato *et al.*, 2017).



Figura 1. Tubo contaminado y tubos libres de patógenos del T1.

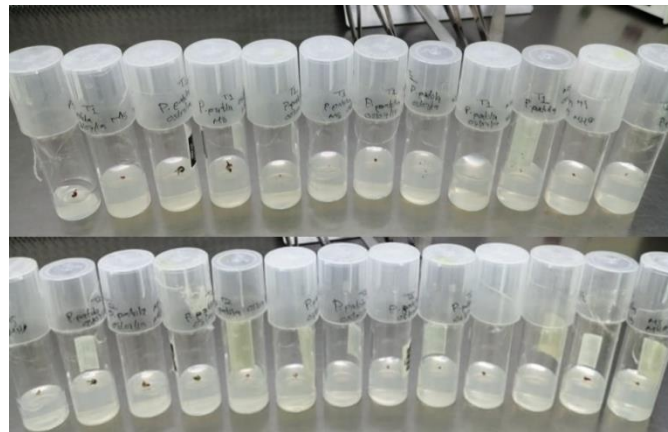


Figura 2. Tubos de T2 y T3 libres de patógenos.

6.2 Tasa germinativa

SEMANA 1

En la figura 3 se muestra la comparación de germinación en todos los tratamientos, se observa que el tratamiento 1 obtuvo mayor cantidad de lotes por arriba de la media de embriones germinados, por otra parte, se puede observar que T2 y T3 obtuvieron tres lotes con más de 3.592 embriones germinados. Los resultados fueron más altos en el testigo, ya que al ser un medio con cantidades considerables de compuestos orgánicos contribuyen a la obtención de grandes volúmenes de material vegetal al incrementar el porcentaje de germinación (Salazar *et al.*, 2013).

El motivo por el cual T2 Y T3 obtuvieron mayor tasa germinativa se atribuye a que el peróxido de hidrógeno incrementa la germinación en algunas semillas de pino, puesto que ablanda la testa y aumenta la permeabilidad del agua y oxígeno (Flores *et al.*, 2008), sin embargo, el ácido 2,4 D en las primeras seis semanas sólo otorga cambios en la coloración y morfología de los embriones (Collado *et al.*, 2006). Cabe resaltar que el medio DCR favorece solamente la emergencia de

brotos y el carbón activado tiene como función reducir hasta un 70% el proceso de oxidación en el tejido vegetal (Ibarra-López *et al.*, 2016).

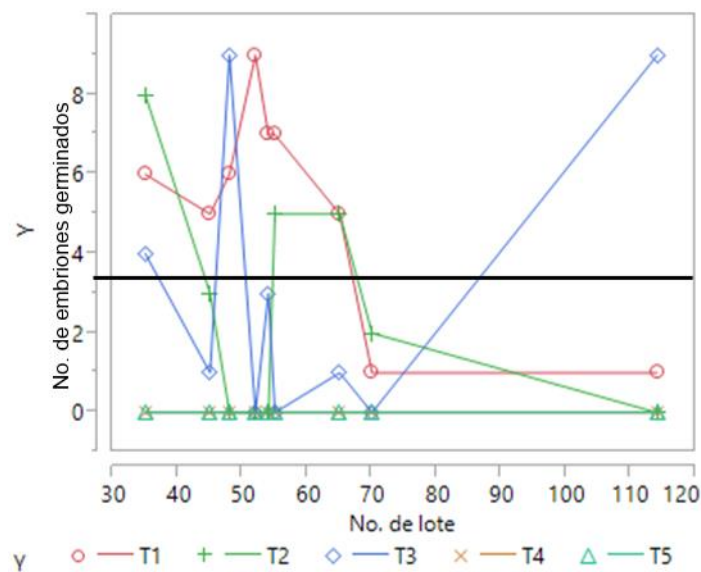


Figura 3. Gráfico de tasa germinativa de los 5 tratamientos.

6.3 Crecimiento en tallo y raíz

El crecimiento del tallo en los tratamientos T1, T2 Y T3 no es estadísticamente significativo, sin embargo, en el tratamiento 3 se obtuvieron los tallos con longitud más prologada (Figura 4). Por otra parte, en la Figura 5 se muestra mayor crecimiento del tallo por lote en el tratamiento de CA+DCR, seguido del tratamiento 1. Cabe señalar que en ambos gráficos no se encuentra registro de los tratamientos 4 y 5, debido a que comenzaron su respuesta en el medio hasta la semana ocho, a partir de ese momento los embriones tuvieron cambios en su morfología y color, dando lugar así a la formación de brotes en mayor cantidad de ellos por lote en el tratamiento 5 (Figura 6). En la semana 12 el crecimiento de los tallos se acrecentó en los lotes del tratamiento 3, además, es importante señalar que aquellos lotes con el tratamiento 2 se localizan muy por debajo de la media, incluso en menor cantidad que T1 (Figura 7). En la figura 8 se puede observar que la formación de callos en ambos tratamientos es similar entre sí, aunque por debajo de la media de los embriones desarrollados en T1 (Figura 8). Cabe señalar, que en la mayoría de los lotes los callos estaban en proceso de oxidación y no desarrollaron brote o raíz (Figura 9).

El déficit de crecimiento en los tratamientos se atribuye a la concentración en gran cantidad de nitrógeno y calcio. Además, es de gran importancia que para que exista una elongación en brotes, la concentración de sales en el medio de inducción previo debe ser

mayor que en el medio de cultivo de elongación (Nandwani *et al.*, 2001). Por otra parte, el medio DCR requiere de reguladores de crecimiento para la inducción y proliferación de callos, y para que haya mayor factibilidad para generar brotes vigorosos para así se obtenga mejor resultado en la supervivencia y enraizamiento en el cultivo *ex vitro* (Imbrogno *et al.*, 2013). En general, las auxinas y citocininas son necesarias en el cultivo *in vitro*, ya que en el proceso de formación de brotes son las encargadas de la producción de cambios fisiológicos y bioquímicos en los tejidos. También, promueven la formación de centros meristemáticos que llevan a la diferenciación posterior de yemas y brotes (Ojeda, 2007).

En el caso particular de la organogénesis a partir de callos se ha logrado la diferenciación de numerosos brotes adventicios en diferentes medios adicionados con BA, sin embargo, la respuesta del tejido declina al ser expuesta a una concentración mayor a 200 mg/l o a una incubación prolongada, causando callosidad excesiva, iniciación radicular retardada o una inhibición de la elongación de las raíces iniciadas; además, el medio empleado para el enraizamiento debe contener una concentración reducida a la mitad de nutrientes inorgánicos (Chávez y De Feria, 2012). La auxina empleada en esta investigación fue 2,4-D, la cual ha sido empleada en diversos estudios para la formación de embriones somáticos en un rango de 1,0-80 mg/l, dependiendo del tejido vegetal y el cultivo empleado. Este regulador de crecimiento influye en la respuesta embriogénica, al no contar el medio con una concentración auxínica adecuada los embriones somáticos modulan los niveles de hormonas endógenas del mismo grupo como el ácido indol-3-acético (AIA) presente en el tejido vegetal y al buscar ese equilibrio, la auxina crea un doble efecto, actúa como regulador de crecimiento o altera el metabolismo de AIA incrementando la sensibilidad de las células al conferirle competencia embriogénica y comienza un proceso de división celular mitótico. Incluso, estudios han demostrado que 2,4-D funciona como una sustancia de estrés, capaz de activar la adquisición de competencia embriogénica en la célula vegetal (Pérez *et al.*, 2013).

SEMANA 4

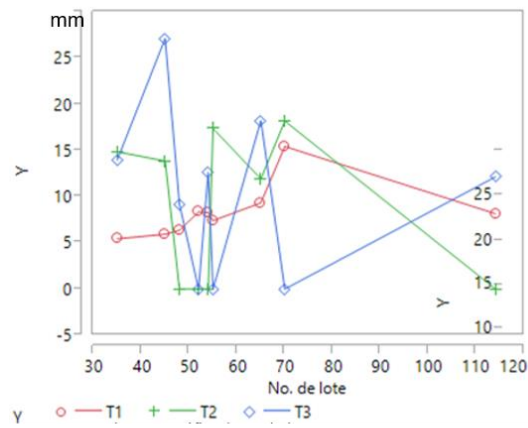


Figura 4. Gráfico de crecimiento en T1, T2 y T3 semana 4.

SEMANA 8

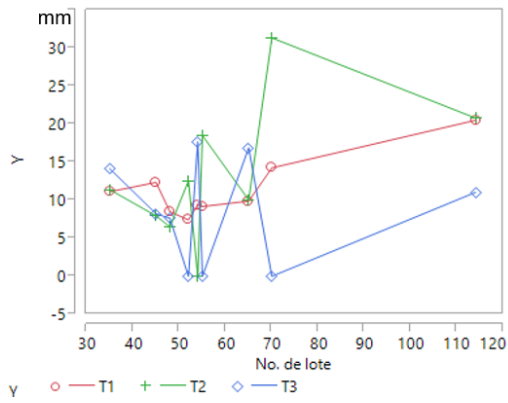


Figura 5. Gráfico de crecimiento en T1, T2 y T3 semana 8.

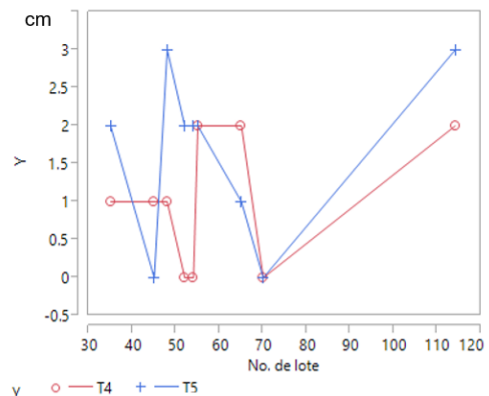


Figura 6. Gráfico de crecimiento en T1, T2 y T3 semana 8.

SEMANA 12

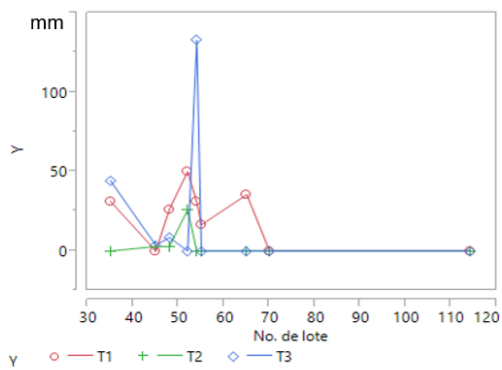


Figura 7. Gráfico de crecimiento en T1, T2 y T3 semana 12.

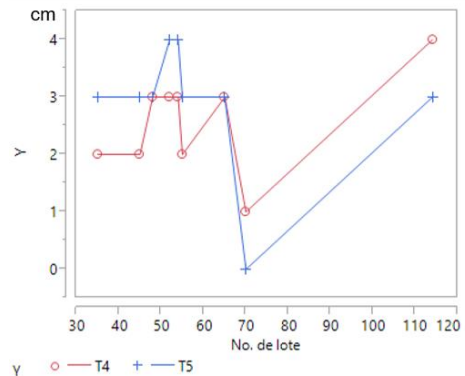


Figura 8. Gráfico de crecimiento en T1, T2 y T3 semana 12.

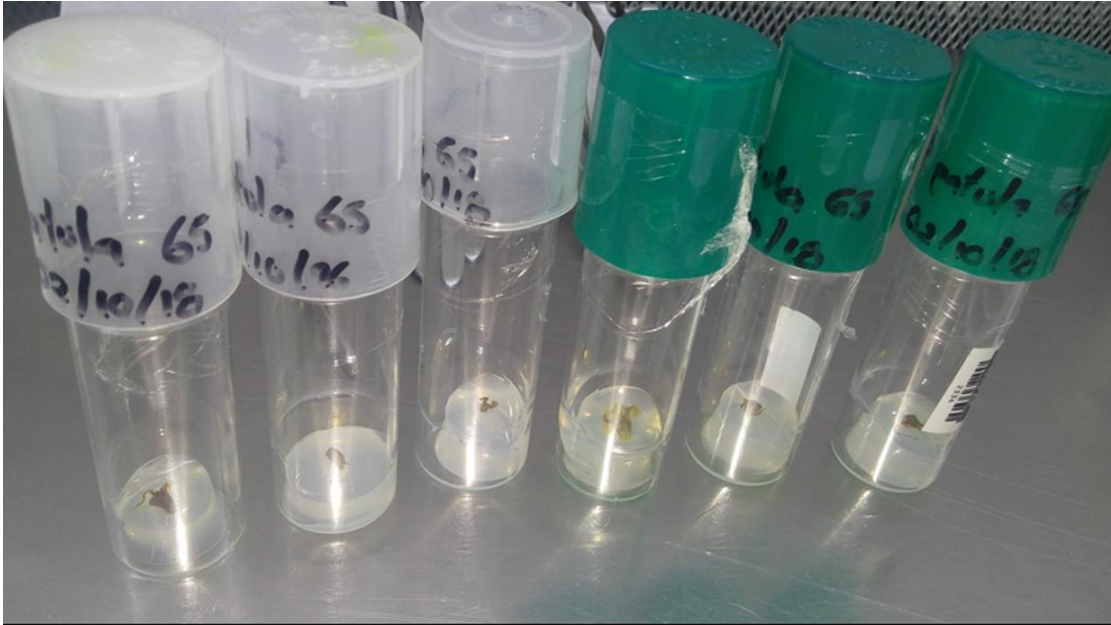


Figura 9. Callos en proceso de oxidación. .

IX. Conclusiones

Los tratamientos de desinfección empleados en la semilla de *Pinus patula* son factibles un 100%, lo que permite disminuir las tasas de mortalidad de plántulas germinadas.

La tasa germinativa en los tratamientos T1, T2 Y T3 se ubicó por arriba de la media en comparación con los otros tratamientos. Sin embargo, el crecimiento no fue el esperado en ninguno de los tratamientos.

X. Recomendaciones

En los tratamientos para germinación y crecimiento del embrión se deben considerar otras opciones en la elaboración de medios, determinar el tiempo que se dejarán en el medio de elongación para después trasladar el tejido vegetal al medio para su enraizamiento, además, conviene considerar nuevas concentraciones en los reguladores de crecimiento para que no sean contraproducentes y se obtenga la callosidad, brotes y raíz deseadas en cada tratamiento.

XI. LITERATURA CITADA

- Alcántara Cortes, J., Castilla Pérez, M. y Sánchez Mora, R. (2017). Importancia de los cultivos vegetales *in vitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias* 1:71-83.
- Bonilla Morales, M., Mancipe Murillo, C. y Aguirre Morales, A. (2015). Conservación *in vitro*: una perspectiva para el manejo de los recursos fitogenéticos. *Investigación Agraria y Ambiental* 6(1): 67-81.
- Castillo-Martínez, C.R., F. García-Campusano, C. Méndez-Espinoza, M.A. Vallejo-Reyna e I. Reyes-Martínez. (2018). Mutagénesis *in vitro* de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco Folleto técnico Núm. 31. Cenic-Comef, INIFAP. Ciudad de México, México. 46p.
- Chávez, M. y De Feria, M. (2012), Aspectos básicos de la propagación *in vitro* del género *Pinus* por organogénesis. *Bioteología Vegetal* 12 (3): 131-142.
- Cibrián, D. (2017). Estado del arte de la línea de investigación de plagas y enfermedades de importancia en viveros forestales. Comisión Nacional Forestal. Informe 2016: 1-27.
- Collado, R., Barbón, R., Agramonte, D., Jiménez-Terry, F., Pérez, M., Gutiérrez, O. (2006). Embriogénesis Somática directa en *Swietenia macrophylla* King. *Bioteología Vegetal* 6(2): 67-71.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. (s.f). Especies forestales que se tornan perjudiciales para los ecosistemas naturales. [En línea]. Obtenido el 16 de marzo del 2019, de: <https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/Invasoras/gef/pdf/2.2-8-poster01.pdf>
- Cruz, H. (2007). Análisis de conos de tres fuentes productoras de semilla de *Pinus patula* Schl. et Cham. Instituto de Genética Forestal. [En línea]. Obtenido el 16 de marzo del 2019, de: <https://www.uv.mx/iif/files/2014/10/TESIS-Hector-MC.pdf>
- Delgado García, L. y Hoyos Sánchez, R. (2015). Multiplicación clonal *in vivo* e *in vitro* de la especie forestal nativa *Aniba perutilis* Hemsl. *Acta Agronómica* 65(2):190-196.
- Directorio Forestal Maderero. (2018). Pino pátula. [En línea]. Obtenido el 16 de marzo del 2019, de: <https://www.forestmaderero.com/contactenos>
- Escobar, S. (2017). *Pinus teocote* Schiede ex Schldl. & Cham. Universidad Autónoma de Chapingo. [En línea]. Obtenido el 15 de marzo del 2019, de: https://www.researchgate.net/publication/326065789_Pinus_teocote_Schiede_ex_Schldl_Cham
- Flores García, A., Álvarez Moctezuma, J., Rodríguez de la O, J. y Corona Ambris, A. (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. *Foresta Veracruzana* 10 (2): 27-33.
- Gillespie, A. (1992). *Pinus patula* Schiede and Deppe. Patula pine. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station 2: 404-409.

- Gómez-Martínez, M., Reyes-Valdés, M., Martínez-Reyna, J., Escobedo-Bocardo, L. y García-Osuna, H. (2010). Rescate de embriones híbridos intergenéricos *Helianthus annuus* x *Tithonia rotundifolia*. *Acta Botánica Mexicana* 93: 111-119.
- González, H. (2007). Evaluación de métodos de desinfección y tipos de explante de la especie vegetal *Piper oradendron* Trel. & Standl., para el establecimiento de su cultivo *in vitro*. Universidad de San Carlos de Guatemala. [En línea]. Obtenido el 20 de marzo del 2019, de: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2617.pdf
- Gutiérrez, B. (2005). Evaluación del Estado Fitosanitario en el invernadero y el vivero forestal de la U.A.A.N. Universidad Autónoma Agraria. [En línea]. Obtenido el 16 de marzo del 2019, de: <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/Unarrow/0058.pdf>
- Ibarra-López, A., Ojeda-Zacarías, M., García-Zambrano, E. y Gutiérrez-Diez, A. (2016). Inducción *in vitro* de brotes de dos cultivares de aguacate raza Mexicana *Persea americana* var. *drymifoli* Schltl. & Cham. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(2):333-347.
- Imbrogno, L., Niella, F., Rocha, P. y Kosky, R. (2013). Efecto de dos medios de cultivo en la elongación *in vitro* de brotes de *Pinus taeda* L. *Biotecnología Vegetal* 13(3): 189-192.
- Instituto Nacional De Bosques. (2017). Pino de Ocote (*Pinus oocarpa* Schiede ex Schltl.); paquete tecnológico forestal. Guatemala, INAB 40 p
- Iriondo, J. y Pita, J. (1998). Bancos de cultivo *in vitro*. *Agropecuaria* (2): 714-715 p.
- Lovato Echeverría, A., Gutiérrez, S. y Carmona, M. (2017). Sensibilidad *in vitro* de *Trichoconiella padwickii* a diversos principios activos usados como fungicidas en el cultivo de arroz. *Revista Argentina de Microbiología* 49(1):70-74.
- Monroy, C. (1997). Evaluación de crecimiento y productividad de *Pinus patula* Schl. et Cham., en la región de Huayacocotla, Veracruz, México. Universidad Autónoma de Nuevo León. [En línea]. Obtenido el 15 de marzo del 2019, de: <http://eprints.uanl.mx/7705/1/1020119003.PDF>
- Muñoz Flores, H., Orozco Gutiérrez, G., Coria Avalos, V. y García Magaña, J. (2010). Factores ambientales de *Pinus patula* Schl. et Cham. Y su adaptación a las condiciones de la Sierra Purépecha, Michoacán. *Foresta Veracruzana* 12(2): 27-33.
- Nandwani D, Kumaria S, Tandon P. (2001) Micropropagation of *Pinus kesiya* Royle ex Gord (Khasi pine). *Gartenbauwissenschaft* 66 (2): 68-71.
- Ojeda, M. (2007). Regeneración *in vitro* del piñón azul *Pinus maximartinezii* (Rzed). Universidad Autónoma de Nuevo León. [En línea]. Obtenido el 01 de octubre de 2019, de: <http://eprints.uanl.mx/5284/1/1020148829.PDF>
- Ospina, C., Hernández, R., Rincón, E., Sánchez, F., Urrego, J., Rodas, C., Ramírez, C. y Riaño, N. (2011). Guías silviculturales para el manejo de especies forestales con miras a la producción de madera en la zona andina colombiana: *Pinus patula*. Cenicafé. [En línea]. Obtenido el 15 de marzo del 2019, de: <https://www.cenicafe.org/es/publications/pinus.pdf>

- Peralta, A. (2007). Efecto del tipo de envase en la calidad y costo de producción de *Pinus patula* Schiede ex Schlechtendal & Chamisso var. *patula* en vivero. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. [En línea]. Obtenido el 15 de marzo del 2019, de: <https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10935/Efecto%20del%20tipo%20de%20envase%20calidad%20y%20costo%20pinus%20patula.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Pérez, J., García, L., Veitía, N., Bermúdez, I. y Collado, R. (2013). Efecto del ácido 2,4-Diclorofenoxiacético en la respuesta embriogénica de soya cultivar incasOY-27. *Cultivos Tropicales* 34(3): 40-44.
- Plata-Rueda, A., Ayala Díaz, I. y Rey, L. (2006). Avances en el rescate de embriones en palma de aceite: una herramienta eficiente en material genético de difícil germinación. *CENIPALMA* 51(139): 1-4.
- Ramírez, E. (2000). Variación de semillas y plántulas de tres procedencias de *Pinus teocote* Schl. & Cham. Universidad Veracruzana. [En línea]. Obtenido el 15 de marzo del 2019, de: <https://www.uv.mx/iif/files/2014/10/Tesis-Elba-Pinus-teocote-MC.pdf>
- Rzedowski, J. (2006). 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Salazar, S., Amaya, A. y Barrientos, F. (2013). Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología* 15(2): 97-105.
- Sánchez González, A. (2008). Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y Bosques* 14(1): 107-120.
- Sánchez-Chiang, N. y Jiménez, V. (2010). Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana* 21(1):193-205.
- Sistema Nacional de Información Forestal. (s.f). *Pinus patula* Schl. et Cham. [En línea]. Obtenido el 15 de marzo del 2019, de: <https://www.cnf.gob.mx:8443/snif/portal/usuarios/fichas-sire>
- Viveros-Viveros, H., Camarillo-Luna, A., Sáenz-Romero, C. y Aparicio-Rentería, A. (2013). Variación altitudinal en caracteres morfológicos de *Pinus patula* en el estado de Oaxaca (México) y su uso en la zonificación. *Bosque* 34(2):173-179.
- Wegier, A., Barba-Escoto, L., García-Campusano, F., Pérez, J. y Flores, A. (2013). Método para el establecimiento *in vitro* de Caoba (*Swietenia macrophylla*) King a partir de explantes vegetativos. Manual técnico Núm.10. CENID-COMEF, INIFAP. México. 84 p.