



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Establecimiento y desarrollo inicial en suelo de plantas
generadas *in vitro* de especies de interés forestal
(*Litsea glaucescens* y *Quercus* spp.)**

TESIS QUE PRESENTA:

I.B.Q. MARÍA GUADALUPE MATA PÉREZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

ASESOR DE TESIS:

DR. EUGENIO MARTÍN PÉREZ MOLPHE BALCH

COMITÉ TUTORAL:

DR. FRANCISCO MORALES DOMÍNGUEZ

DR. OSCAR A. GRAGEDA CABRERA

Aguascalientes, Ags., Junio de 2011.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

TESIS:

**Establecimiento y desarrollo inicial en suelo de plantas
generadas *in vitro* de especies de interés forestal
(*Litsea glaucescens* y *Quercus* spp.)**

MARÍA GUADALUPE MATA PÉREZ _____

Ingeniero Bioquímico. Universidad Autónoma de Aguascalientes
Estudiante del Programa de Maestría en Ciencias Área Biotecnología Vegetal

TUTOR Y MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

DR. EUGENIO MARTÍN PÉREZ MOLPHE BALCH _____

Tutor
Profesor - Investigador
Unidad de Biotecnología Vegetal
Universidad Autónoma de Aguascalientes

Vo. Bo.

DR. FRANCISCO MORALES DOMÍNGUEZ _____

Miembro del Comité Tutorial
Profesor - Investigador
Laboratorio de Biología Molecular de Plantas
Universidad Autónoma de Aguascalientes

Vo. Bo.

DR. OSCAR A. GRAGEDA CABRERA _____

Miembro del Comité Tutorial
Investigador
Campo Experimental Bajío
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP
Celaya, Guanajuato

Vo. Bo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

**I.B.Q. MARÍA GUADALUPE MATA PÉREZ
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL
ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
P R E S E N T E .**

Estimado (a) alumno (a) Mata:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "**Establecimiento y desarrollo inicial en suelo de plantas generadas *in vitro* de especies de interés forestal (*Litsea glaucescens* y *Quercus spp.*)**", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., 3 de junio de 2011
"SE LUMEN PROFERRE"
LA DECANO

M. en C. MARTHA CRISTINA GONZÁLEZ DÍAZ



c.c.p.- Archivo
MCGD,mjda



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES



M. en C. Martha Cristina González Díaz
Decana del Centro de Ciencias Básicas
P R E S E N T E :

Estimada M. en C. González Díaz:

Por este medio le comunico que la I.B.Q. MARÍA GUADALUPE MATA PÉREZ, egresada de la Maestría en Ciencias en el Área de Biotecnología Vegetal, ha concluido satisfactoriamente, tanto su trabajo de tesis, como el escrito derivado del mismo. El título de su proyecto fue: "Establecimiento y desarrollo inicial en suelo de plantas generadas in vitro de especies de interés forestal (*Litsea glaucescens* y *Quercus* spp.)".

Asimismo, le informo que después de revisar el escrito, así como las correcciones hechas al mismo, considero que ya se tiene una versión final satisfactoria y se puede proceder al examen de grado.

A T E N T A M E N T E
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags. a 01 de Junio de 2011

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch
Tutor de Tesis
Departamento de Química
Centro de Ciencias Básicas

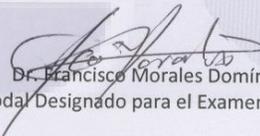


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M en C Martha Cristina González Díaz
Decana del Centro de Ciencias Básicas
Presente:

Por este medio le comunico que he revisado la versión final del escrito de la tesis "**Establecimiento y desarrollo inicial en suelo de plantas generadas *in vitro* de especies de interés forestal (*Litsea glaucescens* y *Quercus spp.*)**", presentada por la alumna I.B.Q. **MARÍA GUADALUPE MATA PÉREZ** como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias en el área de Biotecnología Vegetal. A mi juicio, este documento contiene ya todas las correcciones solicitadas por un servidor al hacer la revisión del mismo. Por lo anterior, considero que se puede proceder ya a su impresión definitiva y a la programación del examen de grado.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags. A 02 de Junio de 2011


Dr. Francisco Morales Domínguez
Sinodal Designado para el Examen de Grado



M. en C. Martha Cristina González Díaz
Decana del Centro de Ciencias Básicas
PRESENTE:

Estimada M. en C. González Díaz:

Por este medio le comunico que la **I.B.Q. MARIA GUADALUPE MATA PÉREZ**, egresada de la Maestría en Ciencias en el Área de Biotecnología Vegetal, ha concluido satisfactoriamente, tanto su trabajo de tesis, como el escrito derivado del mismo. El título de su proyecto fue: **"Establecimiento y desarrollo inicial en suelo de plantas generadas in vitro de especies de interés forestal (*Litsea glaucescens* y *Quercus spp.*)"**.

Asimismo, le informo que después de revisar el escrito, así como las correcciones hechas al mismo, considero que ya se tiene una versión final satisfactoria y se puede proceder al examen de grado.

ATENTAMENTE

Celaya, Guanajuato a 01 de Junio de 2011

Dr. Oscar A. Grageda Cabrera
Miembro del Comité Tutorial
INIFAP Campo Experimental Bajío

RESUMEN

La cubierta forestal está siendo reducida rápidamente de la superficie de la Tierra. Los encinos (*Quercus* spp.) y el laurel silvestre (*L. glaucescens*) son especies forestales importantes en México; ésta última está declarada en peligro de extinción de acuerdo a la norma oficial mexicana. A nivel mundial, en los bosques de encino, hábitat de las especies antes mencionadas, se ha detectado que el “declinamiento” es uno de los problemas más serios que contribuyen a disminuir la salud del árbol y a incrementar su susceptibilidad hacia los patógenos y organismos oportunistas; además, las semillas de las especies *Quercus* muestran varios grados de recalcitrancia y pueden ser almacenadas sólo por un período corto debido a su sensibilidad a la desecación. Asimismo, los sistemas convencionales de propagación clonal (vegetativa) de especies leñosas presentan limitaciones, por lo que el cultivo de tejidos *in vitro* se presenta como una herramienta biotecnológica útil para superar algunas de estas limitaciones. Por otro lado, la transferencia de las plántulas generadas *in vitro* al invernadero es uno de los pasos cruciales en la propagación *in vitro* y se sabe que la simbiosis micorrícica durante el desarrollo inicial aumenta el vigor de las plantas, así como también le confiere resistencia ante patógenos de la raíz. En este proyecto se propagaron *in vitro* algunas especies forestales de importancia en Aguascalientes haciendo énfasis en el estudio del proceso de adaptación al ambiente externo. La micropropagación para *Quercus* spp. se realizó utilizando explantes provenientes de plántulas germinadas *in vitro* en medio de cultivo MS adicionado con 4 mg L⁻¹ de BA, los cuales se enraízan en medio MS_{1/2} después de haberlos expuesto a 10 mg L⁻¹ de AIB. Para *L. glaucescens* la germinación se realizó en medio MS con 4 g L⁻¹ de CA y para el enraizamiento se utilizó medio MS_{1/2} después de la exposición a 1.0 mg L⁻¹ de IBA. Los brotes enraizados se trataron bajo dos enfoques de aclimatación: el enfoque 1 consistió en realizar la inoculación micorrícica *a posteriori* al trasplante, mientras que en el enfoque 2 consistió en realizar la inoculación micorrícica *a priori* al trasplante. Se logró aclimatar plántulas de *L. glaucescens*, las cuales fueron transferidas a suelo en la Estación Biológica “Agua Zarca” de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

ABSTRACT

Forest cover is being reduced rapidly from the surface of the Earth. The oaks (*Quercus* spp.) and Mexican bay (*L. glaucescens*) are important forest species in México; the last one is declared endangered according to Mexican Official Standard. Globally, in oak forests, habitat of the species mentioned above, “declination” has been identified as one of the most serious problems reducing tree health and increasing their susceptibility to pathogens and opportunistic organisms; additionally, *Quercus* species seeds have been shown varying degrees of recalcitrance and can be stored only for a short period time due to their sensitivity to desiccation. In addition, conventional systems of clonal propagation (vegetative) of woody species have limitations. Tissue culture *in vitro* is presented as a useful biotechnological tool to overcome some of these limitations. On the other hand, the transfer of seedlings generated *in vitro* to greenhouse is one of the crucial steps in the adaptation and it is known that mycorrhizal symbiosis increases plant vigor, and also confers resistance to root pathogens. In this project some forest species of importance in Aguascalientes were propagated *in vitro* making emphasis in the study of the process of adaptation to the external environment. Micropropagation of *Quercus* spp. was performed using explants from seedlings germinated *in vitro* in MS culture medium added with 4 mg L⁻¹ BA, which are rooted in MS_{1/2} after being exposed to 10 mg L⁻¹ of IBA. For *L. glaucescens*, germination was performed on MS medium with 4 g L⁻¹ AC and for rooting was used MS_{1/2} medium after the exposition to 1.0 mg L⁻¹ of IBA. The rooted shoots were treated under two approaches acclimation: approach 1 consisted to carry out the inoculation after transplanting, while approach 2 to carry out the inoculation before transplanting. It was possible to acclimate seedlings of *L. glaucescens*, which were transferred to soil in the Biological Station “Agua Zarca” of the Universidad Autónoma de Aguascalientes.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Marco teórico de referencia	1
1.2. Justificación	11
2. Hipótesis de trabajo	13
3. Objetivos	14
3.1. Objetivo general	14
3.2. Objetivos particulares	14
4. Metodología	15
4.1. Selección de las plantas madre y obtención de explantes iniciales	16
4.2. Establecimiento de los cultivos axénicos y proliferación de brotes	19
4.2.1. Desinfección de las bellotas de encinos (<i>Quercus</i> spp.)	19
4.2.2. Germinación <i>in vitro</i> de bellotas y proliferación de brotes de <i>Quercus</i> spp.	21
4.2.3. Desarrollo del método de desinfección de las semillas de <i>L. glaucescens</i>	21
4.2.4. Germinación <i>in vitro</i> de semillas y proliferación de brotes de <i>L. glaucescens</i>	24
4.3. Elongación y enraizamiento de los brotes	25
4.3.1. Inducción del enraizamiento de brotes de <i>Quercus</i> spp.	25
4.3.2. Desarrollo del método de inducción del enraizamiento de brotes de <i>L. glaucescens</i>	26
4.4. Transferencia de plántulas a maceta e inoculación micorrícica	28
4.4.1. Transferencia de plántulas a maceta y aclimatación	28
4.4.2. Efecto de la inoculación micorrícica para el enfoque 1	28
4.4.3. Efecto de la inoculación micorrícica para el enfoque 2	30
4.5. Germinación de semillas de <i>Quercus</i> spp. y <i>L. glaucescens</i> en invernadero	34
4.6. Establecimiento y desarrollo inicial en campo en la Estación Biológica “Agua Zarca”	34
5. Análisis de datos	35
6. Resultados	36
6.1. Selección de las plantas madre y obtención de explantes iniciales	36
6.2. Desinfección de los explantes de <i>Quercus</i> spp.	39
6.3. Desinfección de explantes de <i>L. glaucescens</i>	40
6.4. Germinación y número de brotes por explante de <i>Quercus</i> spp.	43
6.5. Germinación de explantes iniciales de <i>L. glaucescens</i>	49
6.6. Brotación por inducción de yemas axilares de <i>L. glaucescens</i>	51
6.7. Elongación y enraizamiento de los brotes de <i>Quercus</i> spp.	52
6.8. Elongación y enraizamiento de brotes de <i>L. glaucescens</i>	55
6.9. Transferencia a maceta e inoculación micorrícica	58
6.9.1. Transferencia a maceta e inoculación micorrícica para <i>Quercus</i> spp. en el enfoque 1	58
6.9.2. Transferencia a maceta e inoculación micorrícica para <i>L. glaucescens</i> en el enfoque 1	60
6.9.3. Transferencia a maceta e inoculación micorrícica para <i>Quercus</i> spp. en el enfoque 2	62

6.9.4. Transferencia a maceta e inoculación micorrícica para <i>L. glaucescens</i> en el enfoque 2	68
6.10. Germinación de semillas en el invernadero	69
6.11. Establecimiento y desarrollo inicial en campo en la Estación biológica “Agua Zarca”	73
7. Discusión	75
8. Conclusiones	90
9. Anexo A. Lista de abreviaturas	91
10. Anexo B. Biofertilizante	92
11. Glosario	93
12. Bibliografía	96



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Algunos ejemplos de aplicaciones exitosas de micorrización en micropropagación	7
Cuadro 2. Puntos de colecta para laurel silvestre <i>L. glaucescens</i> (al centro de las poblaciones)	17
Cuadro 3. Puntos de colecta de encinos <i>Quercus</i> spp.	18
Cuadro 4. Resumen de los tratamientos aplicados a brotes de laurel silvestre para inducir enraizamiento	27
Cuadro 5. Porcentaje de desinfección de bellotas de <i>Quercus</i> spp.	39
Cuadro 6. Porcentaje de desinfección para las semillas de <i>L. glaucescens</i> bajo diferentes tratamientos	40
Cuadro 7. Porcentaje de desinfección de semillas de <i>L. glaucescens</i> con el tratamiento 9	42
Cuadro 8. Porcentaje de germinación y número promedio de brotes por explante para las especies de <i>Quercus</i> spp.	43
Cuadro 9. Embriogénesis somática en <i>Q. castanea</i>	47
Cuadro 10. Porcentaje de germinación bajo los diferentes tratamientos de desinfección para laurel	49
Cuadro 11. Porcentaje de germinación con el tratamiento de desinfección 9 para las semillas de <i>L. glaucescens</i>	49
Cuadro 12. Brotación por inducción de yemas axilares de <i>L. glaucescens</i>	51
Cuadro 13. Enraizamiento de brotes de <i>Quercus</i> spp. generados <i>in vitro</i>	52
Cuadro 14. Enraizamiento de brotes de <i>L. glaucescens</i> generados <i>in vitro</i> bajo diferentes tratamientos	55
Cuadro 15. Supervivencia al trasplante de las plántulas cultivadas <i>in vitro</i> de la especie <i>Q. eduardii</i> en el enfoque 1	58
Cuadro 16. Crecimiento relativo después del trasplante de las plántulas cultivadas <i>in vitro</i> de la especie <i>Q. eduardii</i> en el enfoque 1	59
Cuadro 17. Supervivencia al trasplante de las plántulas cultivadas <i>in vitro</i> de la especie <i>L. glaucescens</i> en el enfoque 1	60
Cuadro 18. Crecimiento relativo después del trasplante de las plántulas cultivadas <i>in vitro</i> de la especie <i>L. glaucescens</i> en el enfoque 1	60
Cuadro 19. Conteo de esporas en muestras de suelo de bosque de encino y en la muestra de micorriza comercial	62
Cuadro 20. Supervivencia al trasplante y crecimiento relativo de las plántulas cultivadas <i>in vitro</i> de la especie <i>Q. eduardii</i> en el enfoque 2	64
Cuadro 21. Supervivencia al trasplante y crecimiento relativo de las plántulas cultivadas <i>in vitro</i> de la especie <i>Q. resinosa</i> en el enfoque 2	65
Cuadro 22. Supervivencia al trasplante y crecimiento relativo de las plántulas cultivadas <i>in vitro</i> de la especie <i>Q. rugosa</i> en el enfoque 2	67
Cuadro 23. Supervivencia al trasplante y crecimiento relativo de las plántulas cultivadas <i>in vitro</i> de la especie <i>L. glaucescens</i> en el enfoque 2	68
Cuadro 24. Germinación <i>in vivo</i> de las semillas de <i>Quercus</i> spp. y <i>L. glaucescens</i>	69
Cuadro 25. Supervivencia al trasplante en campo en la estación biológica	73

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Esquema general de la metodología del proyecto de tesis “Establecimiento y desarrollo inicial en suelo de plantas generadas <i>in vitro</i> de especies de interés forestal (<i>Litsea glaucescens</i> y <i>Quercus</i> spp.)”.	16
<i>Figura 2.</i> Protocolo de desinfección de bellotas de <i>Quercus</i> spp.	20
<i>Figura 3.</i> Tratamiento de desinfección 9 aplicado a las semillas de <i>L. glaucescens</i> . Este tratamiento se tomó como protocolo de desinfección para las etapas siguientes del proyecto.	23
<i>Figura 4.</i> Protocolo para la determinación cualitativa de infección micorrícica en raíces de muestras de suelo.	32
<i>Figura 5.</i> Protocolo para el aislamiento y conteo de esporas	33
<i>Figura 6.</i> a) Floración de la especie <i>Q. resinosa</i> en campo. b) Algunas de las plantas madre de encinos seleccionadas.	37
<i>Figura 7.</i> Algunos explantes iniciales (bellotas) de <i>Quercus</i> spp.: a) <i>Q. eduardii</i> ; b) <i>Q. resinosa</i> ; c) <i>Q. rugosa</i> ; d) <i>Q. rugosa</i> . La barra en la esquina inferior izquierda de la imagen indica la longitud de 1 cm.	37
<i>Figura 8.</i> a) Floración de laurel silvestre. b) Planta de laurel silvestre (<i>L. glaucescens</i>) en campo.	38
<i>Figura 9.</i> Obtención de los explantes iniciales de <i>L. glaucescens</i> : a) Frutos maduros de laurel silvestre; b) separación manual de la semilla del fruto de laurel silvestre. Cada cuadro mide 70 mm de lado; c) explantes iniciales (semillas) después de lavado con agua corriente y jabón.	38
<i>Figura 10.</i> a) Contaminación de bellotas de <i>Q. resinosa</i> ; notése el daño en las bellotas por picaduras de insectos, así como la oxidación por producción de compuestos fenólicos. b) Contaminación y oxidación de bellotas de <i>Q. laeta</i> .	39
<i>Figura 11.</i> Contaminación de las semillas de <i>L. glaucescens</i> . En la imagen izquierda, para el tratamiento 5; a la derecha, para el tratamiento 6.	41
<i>Figura 12.</i> Contaminación de las semillas de <i>L. glaucescens</i> . Nótese la estructura miceliar sobre la semillas; en la imagen de la derecha, puede apreciarse el inicio de la germinación de la semilla.	41
<i>Figura 13.</i> Brotación múltiple de bellota de <i>Q. eduardii</i> en medio MS adicionado con 4 mg L ⁻¹ de BA. Nótese el fenómeno de dominancia apical en el brote central.	44
<i>Figura 14.</i> Germinación de bellota de <i>Q. rugosa</i> en medio MS adicionado con 4 mg L ⁻¹ de BA. Derecha: algunos explantes con brotación múltiple.	44
<i>Figura 15.</i> Germinación de bellotas de <i>Q. grisea</i> en medio MS adicionado con 4 mg L ⁻¹ de BA. a) Brotación inicial. Nótese la oxidación severa de los explantes y del medio debida a la excreción de compuestos fenólicos. b) Formación de tejido caloso y brotes. Nótese la oxidación severa del explante.	45
<i>Figura 16.</i> Bellotas de <i>Q. laeta</i> en medio MS adicionado con 4 mg L ⁻¹ de BA. Nótese la oxidación de los explantes, la formación de tejido caloso y la ausencia de brotes.	45
<i>Figura 17.</i> Oxidación y contaminación de explantes de <i>Q. resinosa</i> .	46
<i>Figura 18.</i> Brotación múltiple de explantes de <i>Q. resinosa</i> en medio MS adicionado con 4 mg L ⁻¹ de BA.	46
<i>Figura 19.</i> Germinación de bellotas de <i>Q. castanea</i> en medio MS adicionado con 4 mg L ⁻¹ de BA. Nótese la formación de embriones somáticos.	47

<i>Figura 20.</i> Embriones somáticos de <i>Q. castanea</i> en diferentes estadios: a) globular, b) corazón, y c) torpedo.	48
<i>Figura 21.</i> Proceso de germinación <i>in vitro</i> y obtención de brotes de laurel <i>L. glaucescens</i> en condiciones axénicas en medio MS adicionado con 4 g L ⁻¹ de CA. a) Germinación de semilla; b) Corte del brote apical y estimulación del crecimiento de brotes; c) Obtención de brotes por inducción de yemas axilares; d) Obtención de brotes. Note el crecimiento del brote a partir de las yemas axilares.	50
<i>Figura 22.</i> Brotación por inducción de yemas axilares de <i>L. glaucescens</i> en medio MS adicionado con 0.5 mg L ⁻¹ de BA	51
<i>Figura 23.</i> a) Brote de <i>Q. eduardii</i> en medio de cultivo MS _½ adicionado con 10 mg L ⁻¹ de IBA para inducir el enraizamiento. Nótese la ausencia de raíces. b) Plántula de <i>Q. eduardii</i> después de 22 días de la inducción del enraizamiento.	53
<i>Figura 24.</i> a) Brotes de <i>Q. rugosa</i> en medio de cultivo MS _½ adicionado con 10 mg L ⁻¹ de IBA para inducir el enraizamiento. Nótese la ausencia de raíces. b) Brote de <i>Q. rugosa</i> con inicio de formación de raíces. c) Plántula de <i>Q. rugosa</i> después de 30 días de la inducción de enraizamiento.	53
<i>Figura 25.</i> Brote de <i>Q. grisea</i> después de 30 días de inoculado en medio MS _½ . Nótese la formación de tejido calloso en la base del explante, así como la necrosis en general del brote.	54
<i>Figura 26.</i> a) Brotes de <i>Q. resinosa</i> en medio de cultivo MS _½ adicionado con 10 mg L ⁻¹ de IBA para inducir el enraizamiento; b) Plántula de <i>Q. resinosa</i> obtenida <i>in vitro</i> ; c) Raíces de la plántula, nótese el inicio de la formación de raíces secundarias.	54
<i>Figura 27.</i> Brotes de laurel silvestre de plántulas germinadas <i>in vitro</i> en el tratamiento de enraizamiento 1 (ANA a concentración 0.5 mg L ⁻¹ por 15 días).	56
<i>Figura 28.</i> Brotes de <i>L. glaucescens</i> sometidos al tratamiento 2 en medio MS _{1/2} , 30 días después de la exposición al RCV. a) Brote de laurel sometido a 0.5 mg L ⁻¹ IBA; b) brote de laurel sometido a 1.0 mg L ⁻¹ IBA; c) brote de laurel sometido a 1.5 mg L ⁻¹ IBA.	56
<i>Figura 29.</i> Brotes de <i>L. glaucescens</i> en el tratamiento 3 sometidos a: a) 1.5 mg L ⁻¹ IBA, b) 2.0 mg L ⁻¹ IBA, y c) 2.5 mg L ⁻¹ IBA, 30 días después de ser cambiado a medio sin RCV.	57
<i>Figura 30.</i> Brotes de <i>L. glaucescens</i> en el tratamiento 4 sometidos a: a) 0.5 mg L ⁻¹ IBA, b) 1.0 mg L ⁻¹ IBA y c) 1.5 mg L ⁻¹ IBA, 30 días después de ser cambiado a medio sin RCV.	57
<i>Figura 31.</i> Transferencia inicial a macetas de plántula cultivada <i>in vitro</i> de <i>Q. eduardii</i> . A la izquierda, bajo el tratamiento con inóculo bruto; a la derecha, bajo el tratamiento con micorriza comercial <i>G. intraradices</i> . Nótese la diferencia en la coloración de las hojas, siete días después de la transferencia.	59
<i>Figura 32.</i> Trasferencia a maceta de <i>L. glaucescens</i> en el enfoque 1 con el tratamiento 1: a) durante el trasplante a maceta; b) a los 14 días después del trasplante.	61
<i>Figura 33.</i> Trasferencia a maceta de <i>L. glaucescens</i> en el enfoque 1 con el tratamiento 2: a) durante el trasplante a maceta; b) a los 14 días después del trasplante.	61
<i>Figura 34.</i> Observación microscópica (10x) de los aislados de esporas. a) Esporas en el aislado de suelo de laurel; b) Esporas en el aislado de suelo de laurel. Nótese la presencia de diversos tipos de esporas; c) Espora en el aislado de suelo de encino; d) Esporas de micorriza comercial <i>G. intraradices</i> .	63
<i>Figura 35.</i> Una plántula cultivada <i>in vitro</i> de la especie <i>Q. eduardii</i> bajo el tratamiento 3: a) después de 21 días del trasplante a maceta; b) después de 28 días del trasplante a maceta, nótese la formación de hojas nuevas en la parte apical.	64

<i>Figura 36.</i> Plántulas cultivadas <i>in vitro</i> de la especie <i>Q. resinosa</i> después de 21 días del trasplante a maceta: a) bajo el tratamiento 1; b) bajo el tratamiento 2; c) bajo el tratamiento 3; d) bajo el tratamiento 4.	66
<i>Figura 37.</i> Plántula cultivada <i>in vitro</i> de la especie <i>Q. rugosa</i> después de 21 días del trasplante a maceta bajo el tratamiento 3.	67
<i>Figura 38.</i> Plántulas cultivadas <i>in vitro</i> de la especie <i>L. glaucescens</i> después de 21 días del trasplante a maceta: a) bajo el tratamiento 1; b) bajo el tratamiento 2; c) bajo el tratamiento 3.	69
<i>Figura 39.</i> <i>Q. resinosa</i> en invernadero después de 5 meses de la siembra de semillas. a) Bellota en sustrato turba. Nótese las picaduras de insectos, la presencia de hongos saprófitos y ausencia de germinación; b) Plantas bajo tratamiento 1 (turba); c) Plantas bajo el tratamiento 2 (turba con micorriza comercial <i>G. intraradices</i>).	70
<i>Figura 40.</i> <i>Q. eduardii</i> en invernadero después de 5 meses de la siembra de semillas. a) Plantas bajo el tratamiento 1 (turba). b) Plantas bajo el tratamiento 2 (turba con micorriza comercial <i>G. intraradices</i>).	70
<i>Figura 41.</i> <i>Q. potosina</i> en invernadero después de 5 meses de la siembra de semillas. a) Plantas bajo el tratamiento 1 (turba). b) Plantas bajo el tratamiento 2 (turba con micorriza comercial <i>G. intraradices</i>).	71
<i>Figura 42.</i> <i>L. glaucescens</i> en invernadero después de 2 meses de la siembra de semillas. a) Plantas bajo el tratamiento 1 (turba); b) acercamiento de plantas bajo el tratamiento 1. c) Plantas bajo el tratamiento 2 (turba con micorriza comercial <i>G. intraradices</i>); d) acercamiento de plantas bajo el tratamiento 2. <i>Nota:</i> Cada cuadro en el fondo mide 1 cm de lado.	72
<i>Figura 43.</i> Establecimiento inicial en suelo de especies forestales generadas <i>in vitro</i> en la estación biológica "Agua Zarca": a) <i>L. glaucescens</i> generado <i>in vitro</i> junto a uno silvestre; b) <i>L. glaucescens</i> ; c) <i>Q. eduardii</i> .	73
<i>Figura 44.</i> Presentación del Biofertilizante INIFAP® (Micorriza comercial <i>Glomus intraradices</i>) [Tomado de Aguirre-Medina <i>et al.</i> , 2009].	92

**Establecimiento y desarrollo inicial en suelo de plantas
generadas *in vitro* de especies de interés forestal
(*Litsea glaucescens* y *Quercus* spp.)**

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MARCO TEÓRICO DE REFERENCIA

Los árboles son una parte integral de la vida humana y un componente vital de la biodiversidad. Debido a la rápida deforestación, reducción de los recursos genéticos aunado con el aumento en las necesidades humanas, la cubierta forestal está siendo reducida tremendamente de la superficie de la Tierra. Existe una gran necesidad de conservar estos ecosistemas por ambos valores, ambiental y estético (Giri *et al.*, 2004).

La flora vascular mexicana está representada aproximadamente por 22 000 especies, 9300 de ellas son endémicas; 2500 especies habitan exclusivamente o son características de los bosques nubosos mexicanos. Estas especies constituyen el 10% del número total de plantas vasculares estimadas para México, representando gran riqueza en un área relativamente pequeña. Aproximadamente 70 de estos taxa han sido incluidos en alguna categoría de riesgo en la más reciente versión de la Norma Oficial Mexicana 059 - "NOM-059", Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales 2002 (Luna Vega *et al.*, 2006).

En el estado de Aguascalientes, existen zonas montañosas (la Sierra del Laurel y la Sierra Fría) dentro de las cuales existen varias especies forestales no maderables importantes. Uno de los árboles importantes es el laurel silvestre (*Litsea glaucescens*), declarado en peligro de extinción de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001. Los encinos (*Quercus* spp.) también forman parte importante de dichas zonas en nuestro estado, y aún cuando no han sido

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

declarados como especie en peligro de extinción, la población de los mismos está siendo disminuida rápidamente por diversos factores. Por ello, el presente proyecto de tesis está enfocado en estas especies vegetales.

La familia Lauraceae agrupa alrededor de 2500 especies en aproximadamente 50 géneros, distribuidas principalmente en regiones tropicales y subtropicales en todo el mundo. En México no es una familia particularmente diversa, pero está representada por elementos arbóreos importantes de algunas comunidades vegetales, mismas que son interesantes también desde el punto de vista fitogeográfico y por su diversidad biológica. Las especies mejor representadas en los herbarios (con más de 130 y hasta 350 colectas en total por especie) son *Litsea glaucescens*, *Nectandra coriácea*, *N. salicifolia*, *Ocotea helicterifolia* y *Persea americana* (Lorea, 2002). El género *Litsea* comprende alrededor de 400 especies, la mayoría nativas de Asia. Generalmente son árboles perennes aromáticos y arbustos con flores dioicas (Mao *et al.*, 2000). El género *Litsea*, de afinidad templada, no posee especies endémicas en el sur de México, pero a nivel nacional llega al 66% de endemismo. En contraposición con el patrón general de distribución del endemismo en México, que se concentra en las zonas áridas, las lauráceas no tienen presencia en este tipo de ambientes. Por el contrario, la mayor diversidad y endemismo de la familia se encuentra en áreas más bien húmedas (Lorea, 2002).

La especie *Litsea glaucescens*, es conocida con varios nombres comunes, Aureli (tarahumara), Canelillo, Chico, Ecpatli de chietla (náhuatl), Laurel, Laurelillo, Sufricalla, Zitzuch. Es un arbusto o árbol, generalmente de 3-12 m de alto, glabros o puberulento, con frecuencia muy ramificado; pecíolos delgados, de menos de 2 cm de largo, láminas lanceoladas o elíptico – lanceoladas, hasta de 8 cm de largo por 2.5 cm de ancho, ápice agudo o acuminado, borde liso, base aguda o subaguda, penninervadas, coriáceas, glabras, brillantes, envés con frecuencia glauco; flores de 3 a 6 rodeadas por un involucre de 4 brácteas caedizas, uno solo de estos grupos o varios en fascículos axilares, flores unisexuales, amarillentas o de color crema; lóbulos del perianto ovales, redondeados en el ápice; estambres en 3 series; fruto globoso, negro, de 9 mm de diámetro. Tiene varios usos, las hojas se usan como condimento y para hacer una bebida caliente; en el uso medicinal, la infusión del follaje se usa en caso de entuertos postparto, esterilidad, dismenorrea, además este mismo conocimiento también se aplica en baños. El té de las hojas se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

usa para la congestión de pecho, tos, enfermedades del oído, enfermedades gastrointestinales (gases, cólicos, indigestión, dolor estomacal). El vapor del cocimiento de esta especie más otras plantas, junto con chocolate se inhalan para eliminar el aire de la matriz. Toda la parte aérea se usa en infusión con naranjo, juncia y flor de muerto para apresurar el parto y con ruda, cinco negritos, saúco, hinojo y clavo para la tosferina y tos grave. A esta planta se le atribuyen propiedades antiespasmódicas, anti diarreicas, que alivian dolores e infecciones de garganta y anti febrifugas, así como para el combate de dolores por frío, escalofrío, hipo por bañarse y cólicos en general. Esta planta tiene como hábitat bosques húmedos de encino y pino-encino, crece entre los 1300 y 2500 msnm (SEMARNAT, 2006).

Con respecto a *Quercus* spp. L., pertenecen a la familia Fagaceae, son comunes en regiones templadas, tropicales y semiáridas a partir de los 3 100 m en altitud sobre el nivel del mar (Oyama *et al.*, 2006). Se consideran dos centros de diversidad para el género, el primero se localiza en Asia, donde se conocen alrededor de 125 especies de encinos, el segundo se presenta en México (Valencia, 2006) con 161 especies incluyendo 109 endémicas, lo cual corresponde a ca. 30% del total de número de especies del género reportadas globalmente (Oyama *et al.*, 2006). Los encinos pueden formar líneas densas en las principales cadenas montañosas de México, tales como la Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental, Eje Neovolcánico Transversal, y Sierra Madre del Sur, cubriendo aproximadamente 6.4 % del territorio mexicano. Los encinos son árboles o arbustos que viven en las partes bajas de las montañas en donde forman bosques de varias especies de encinos o mezclados con varias especies de pinos. Algunas pocas especies viven cerca del nivel del mar. Tienen hojas duras (coriáceas), con márgenes lisos, serrados u ondulados. Sus flores son catkins y sus frutos son las bellotas (Valencia, 2006). En México, los encinos se pueden agrupar en encinos blancos (*Leucobalanus*), en encinos rojos (*Erythrobalanus*) y en encinos negros o de copa dorada (*Protobalanus*), estos últimos restringidos a Baja California y Sonora. Los encinos blancos tienen bellotas dulces o ligeramente agrias que maduran en seis meses. Los encinos rojos y negros tienen bellotas amargas que tardan 18 meses en madurar (Valencia, 2006).

En el Estado de Aguascalientes se han reportado 17 especies de encino (*Quercus* spp.), siendo las más abundantes *Q. potosina*, *Q. eduardii*, *Q. laeta*, *Q. grisea*, *Q. resinosa* y *Q. sideroxylla*. Las mayores áreas ocupadas por encinos en Aguascalientes se localizan también en la

Sierra Fría, en el Norte y Noroeste del Estado. Sin embargo, hay datos en el sentido de que a causa de la actividad humana el área cubierta por bosques de encino ha disminuido de manera constante a lo largo del tiempo, quedando en muchas áreas del Estado solo pequeños manchones de lo que antes fueron poblaciones extensas (De la Cerda-Lemus 1999). Referente a estas actividades humanas cabe mencionar que para producir carbón vegetal es bueno cualquier material leñoso, sin embargo, comúnmente se elabora a partir de leña de encino debido a que ésta tiene características que hacen que el carbón sea de mejor calidad. Por otra parte, en bosques manejados para producir madera de pino –una especie que tiene mayor valor en el mercado- los encinos son considerados un estorbo. Esto se debe a que los pinos no pueden crecer bien bajo la sombra de encinos maduros. También a que la mayoría de los encinos tienen troncos chaparros, muchas ramas, su madera es muy dura y al secarse se cuartea fácilmente; características que limitan su uso para la producción de madera aserrada empleada en la construcción de casas o muebles. Desde un punto de vista ambiental, estos árboles son importantes porque contribuyen a proteger los suelos de la erosión y ofrecen un hábitat adecuado para muchas especies de fauna silvestre, como aves y mamíferos pequeños. (García Molina, 2008).

Uno de los problemas más serios que se ha detectado en los bosques de encino a nivel mundial es el declinamiento. Este problema no está definido por un agente causal único, sino por varios factores que contribuyen a disminuir la salud del árbol y a incrementar su susceptibilidad hacia los patógenos o incluso, hacia organismos oportunistas (Romo Díaz *et al.*, 2007).

El medio preferido de propagación de encinos es por semillas, lo que favorece la amplia diversidad genética de estas especies. Sin embargo, las posibilidades de reproducción son limitadas por la larga vida necesaria para alcanzar la madurez fisiológica, por la ocurrencia irregular de bellotas, por la baja calidad de las semillas y las dificultades de almacenamiento de ellas. Las semillas de las especies *Quercus* muestran diferentes grados de recalcitrancia y pueden ser almacenadas sólo por un período corto debido a su sensibilidad a la desecación. Además. Los métodos convencionales de propagación vegetativa de árboles maduros por esquejes están asociados con dificultades en el enraizamiento (Ostrolucká *et al.*, 2007).

Los problemas en la propagación de encinos de material juvenil o maduro podrían ser resueltos mediante el uso de técnicas *in vitro*. La propagación *in vitro* de yemas dormantes colectadas a partir de árboles maduros es importante especialmente para la silvicultura comercial, para la propagación clonal de genotipos seleccionados con una valiosa calidad maderable, resistente o tolerante a enfermedades y a condiciones con alta contaminación. La propagación *in vitro* a partir de material juvenil permite la producción de un gran número de plantas vitales de diversos genotipos necesarias para el mantenimiento de la diversidad genética en los ecosistemas forestales. Los embriones cigóticos maduros e inmaduros son fuentes potencialmente adecuadas de explantes para la micropropagación de encinos (Ostrolucká *et al.*, 2007).

Entonces, las actividades de restauración son necesarias cuando los ecosistemas han sido disturbados ya sea por fuerzas naturales o antropogénicas. Algunos sistemas pueden estar tan severamente impactados que pueden ser necesarias actividades mejoradoras, por ejemplo, fertilización, encalado, control de la tierra y preparación del micrositio (Harrington, 1999).

Se han explotado los enfoques convencionales para la propagación y mejoramiento, pero los esfuerzos son restringidos a las especies de más rápido crecimiento. Estos métodos son limitados con varios cuellos de botella debidos a que los árboles generalmente son de lento crecimiento, longevos, plantas sexualmente incompatibles entre sí y altamente heterocigotas (Giri *et al.*, 2004).

Para evitar estas limitantes, ha sido desplegada la propagación clonal o vegetativa para la recuperación de efectos genéticos dominantes, aditivos y epistáticos para seleccionar genotipos superiores. Los métodos de cultivo de tejidos vegetales y transformación genética ofrecen una opción importante. Las intervenciones del enfoque biotecnológico para la regeneración *in vitro*, técnicas de micropropagación y estudios de transferencia de genes han tenido gran impulso (Giri *et al.*, 2004).

La micropropagación de árboles ofrece un rápido medio de producir un abastecimiento para los programas de forestación, producción de biomasa y conservación de germoplasmas raros o de élite (Giri *et al.*, 2004). Sin embargo, en general las especies leñosas son difíciles de

regenerar bajo condiciones *in vitro* y una micropropagación exitosa depende primeramente de la calidad del explante y los reguladores de crecimiento vegetal usados en el medio de cultivo. El éxito de la regeneración *in vitro* depende del control de la morfogénesis, lo cual está influenciado por varios factores, a saber, antecedentes génicos, tipo de tejido del explante, componentes nutricionales, reguladores del crecimiento y medio de cultivo (Giri *et al.*, 2004).

Entonces, el cultivo de tejidos es una de las más importantes aplicaciones de la biotecnología moderna. Las técnicas de micropropagación tradicionales permiten una rápida producción de alta calidad, libres de enfermedad y material vegetal uniforme en relativamente cortos períodos de tiempo. Ofrece varias ventajas que no son posibles con técnicas de propagación convencional. El cultivo de tejidos vegetales depende del crecimiento de plantas sobre sustratos ricos en nutrientes desprovistos de microbios, lo cual resulta en la producción de plántulas sin ninguna simbiosis mutualista. Aunque han sido empleadas en el pasado varias técnicas para mejorar el crecimiento y reducir las tasas de mortalidad de las plántulas durante la trasplatación, la mayoría de ellas tienen como objetivos básicamente el control de las condiciones ambientales *e. g.*, incrementar la intensidad de la luz y alterar la concentración de CO₂. Se ha reportado que inocular las plántulas micropropagadas con hongos micorrízicos arbusculares (AMF, *Arbuscular mycorrhizal fungi*) mejora el desempeño vegetal y juega un papel significativo en el aseguramiento de la salud de las plántulas. Más aún, el período de aclimatación de las plántulas micropropagadas puede también ser acortado mediante la aplicación de micorrizas arbusculares. Existen varios ejemplos para mostrar los efectos benéficos de los AMF en el mejoramiento del crecimiento y desarrollo de varias especies de floricultura, horticultura y árboles forestales plantadas *in vitro* (Cuadro 1) (Kapoor *et al.*, 2008). Por mencionar uno de estos ejemplos, en una especie leñosa frutal *Annona cherimola* Mil1 (Cuadro 1), la colonización fúngica confirmó ejercer influencia significativa sobre la morfología del sistema radical, incluyendo la intensidad incrementada de la ramificación de los laterales primarios, el incremento en el número de raíces y longitud de las mismas. Estas alteraciones en la morfología de las raíces estuvieron ligadas a la mejora de la absorción de nutrientes del suelo (Yao *et al.*, 2009).

Cuadro 1. Algunos ejemplos de aplicaciones exitosas de micorrización en micropropagación
(Tomada de Kapoor *et al.*, 2008)

Nombre de la especie vegetal	Especie de AMF usado	Referencia
<i>Coffea arabica</i> L.	<i>Gigaspora margarita</i>	Souza <i>et al.</i> (1991)
<i>Actinidia deliciosa</i> (Kiwi)	<i>Glomus</i> sp. Cepa E3	Schubert <i>et al.</i> (1992)
<i>Anthyllis cytisoides</i> , <i>Spartium junceum</i>	<i>G. fasciculatum</i>	Salamanca <i>et al.</i> (1992)
Manzana y durazno portainjertos	<i>Glomus</i> sp. Cepa A6	Sbrana <i>et al.</i> (1992)
<i>Tetraclinis articulate</i>	<i>G. fasciculatum</i>	Honrubia y Morete (1992)
Manzana (M9, M26, Golden)	<i>G. fasciculatum</i> , <i>G. mosseae</i> , <i>G. intraradices</i>	Branzanti <i>et al.</i> (1992)
<i>Persea americana</i> (Aguacate)	<i>G. fasciculatum</i>	Vidal <i>et al.</i> (1992)
<i>Persea americana</i>	<i>G. deserticola</i> , <i>G. mosseae</i>	Azcon – Aguilar <i>et al.</i> (1992)
<i>Platanus acerifolia</i>	<i>G. fasciculatum</i>	Tisserant y Gianinazzi – Pearson (1992)
<i>Prunus avium</i> , <i>Spiraea vulgaris</i> , <i>Syringa japonica</i>	<i>G. fasciculatum</i> , <i>G. intraradices</i> (LPA8), <i>Glomus</i> aislado (LPA21)	Bouhired <i>et al.</i> (1992)
<i>Allium cepa</i>	<i>Gigaspora rosea</i> , <i>Glomus mossae</i>	Rancillac <i>et al.</i> (1996)
<i>Annona cherimoya</i>	<i>G. deserticola</i>	Azcon – Aguilar <i>et al.</i> (1996)
Manzana silvestre cv. Marjatta	<i>G. claroideum</i> , <i>G. fistulosum</i>	Uosukainen y Vestberg (1996)
<i>Fragaria vesca</i> (Fresa)	<i>G. fistulosum</i>	Cassels <i>et al.</i> (1996)
<i>Pyrus communis</i>	<i>Glomus</i> sp.	Rapparini <i>et al.</i> (1996)
<i>Tetraclinis articulate</i>	<i>G. fasciculatum</i>	Morte <i>et al.</i> (1996)
<i>Juglans regia</i> (Nogal)	<i>G. mosseae</i> , <i>G. intraradices</i>	Dolcet-Sanjuan <i>et al.</i> (1996)
<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>G. fasciculatum</i>	Naqvi y Mukerji (1998)
<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>G. fasciculatum</i> , <i>G. microcarpum</i>	Puthur <i>et al.</i> (1998)
<i>Casuarina equisetifolia</i>	<i>G. mosseae</i>	Mark <i>et al.</i> (1999)
<i>Musa</i> spp. cv. Pacovan	<i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>G. clarum</i> , <i>G. etunicatum</i>	Yano-Melo <i>et al.</i> (1999)
<i>Syngonium podophyllum</i> y <i>Dracaena</i> sp.	<i>Glomus Gigaspora</i> , <i>Scutellospora</i> spp.	Gaur y Adholeya (1999)
<i>Fragaria X ananassa</i> cv. Elvira	<i>G. clarum</i> , <i>G. etunicatum</i> , <i>G. intraradices</i> , <i>Gi. Rosea</i> , <i>Gi. Gigantea</i> , <i>G. margarita</i> , <i>Scutellospora calospora</i> , <i>S. heterógama</i> , <i>S. pérsica</i>	Taylor y Harrier (2001)
<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar Reyna	<i>G. albidum</i> , <i>G. diaphanum</i> , <i>G. claroides</i>	Estrada-Luna y Davies (2001)
<i>Lilium</i> sp. (Híbrido asiático “Gran Paradiso”)	<i>G. intraradices</i> aislados	Varshney <i>et al.</i> (2002)
<i>Musa</i> spp. cv. Grand Naine	<i>G. intraradices</i>	Declerck <i>et al.</i> (2002)
Papa cv. Goldrush	<i>G. etunicatum</i>	Yao <i>et al.</i> (2002)
<i>Citrus limon</i> L. “Zagara Bianca”	<i>G. mosseae</i> (BEG 116), <i>Glomus</i> sp.	Quatrini <i>et al.</i> (2003)
<i>Echinacea pallida</i>	<i>G. mosseae</i> , <i>Gigaspora ramisporophora</i> , <i>Scutellospora fulgida</i> , <i>Entrophospora columbiana</i>	Lata <i>et al.</i> (2003)
<i>Capsicum annum</i> L. (Chile ancho cv. San Luis)	<i>G. albidum</i> , <i>G. claroides</i> , <i>G. diaphanum</i>	Estrada – Luna y Davies (2003)
<i>Musa</i> spp. cv. Grande Naine	<i>G. proliferum</i> , <i>G. versiforme</i> , <i>G. intraradices</i>	Jaizme – Vega <i>et al.</i> (2003)
<i>Diospyros kaki</i> “Rajo”	<i>G. intratadices</i> , <i>G. mosseae</i>	Marin <i>et al.</i> (2003)
<i>Ficus benjamina</i>	<i>G. mosseae</i>	Srinath <i>et al.</i> (2003)
<i>Podophyllum peltatum</i> L.	<i>Entrophospora columbiana</i> , <i>G. mosseae</i> , <i>Gigaspora ramisporophora</i> , <i>Scutellospora fulgida</i>	Moraes <i>et al.</i> (2004)
<i>Vitis vinifera</i> L.	<i>G. mosseae</i> , <i>G. manihotis</i> , <i>G. deserticola</i> , <i>Gigaspora gigantea</i> , <i>Acaulospora laevis</i>	Singh <i>et al.</i> (2004)
<i>Curcuma zedoria</i> ROSCOE	<i>G. etunicatum</i>	Miachir <i>et al.</i> (2004)
<i>Ipomoea carnea</i> ssp. <i>Fistulosa</i> (Gloria de la mañana)	<i>Gigaspora rosea</i> , <i>G. deserticola</i> , <i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i> , <i>G. etunicatum</i> , <i>G. monosporus</i> , <i>G. brasilianum</i>	Carpio <i>et al.</i> (2005)
Banana cv. Grade Naine	<i>G. manihotis</i>	Rodríguez-Romero <i>et al.</i> (2005)
<i>Rosa hybrida</i> L. cv. New Dawn	<i>G. intraradices</i>	Piniór <i>et al.</i> (2005)
<i>Annona cherimola</i> Mill.		Padilla y Encina (2005)
<i>Vitis vinifera</i> L.	<i>G. mosseae</i> , <i>G. manihotis</i> , <i>Scutellospora heterógama</i> , <i>Gigaspora gigantea</i> , <i>Entrophospora colombiana</i> , <i>Acaulospora laevis</i> , <i>A. scrobiculata</i>	Krishna <i>et al.</i> (2006)

En los ecosistemas de bosque boreal y templado, la mayoría de las especies arbóreas forman ectomicorrizas. Aunque los hongos ectomicorrícicos son un grupo diverso de un estimado de 5000 – 6000 especies diferentes pertenecientes a Basidiomycota y Ascomycota, la mayoría de estos taxa son relativamente selectivos de sus especies vegetales hospederas. Además de los hongos ectomicorrícicos, existe un grupo menos diverso que forma estructuras arbusculares y vesículas dentro de las células hospederas; este grupo son las micorrizas arbusculares y son el tipo de micorriza más intensivamente investigado. Son abundantes en las especies herbáceas, así como en los árboles forestales tropicales, pero también ocurren en raíces de algunas especies arbóreas templadas. Aunque la mayoría de las especies arbóreas son ya sea estrictamente micorrícicas arbusculares o ectomicorrícicas, algunas especies son capaces de mantener ambos tipos de micorrizas (Polle *et al.*, 2009).

La simbiosis micorrícica arbuscular es una asociación mutualista formada entre plantas y una amplia variedad de hongos del phylum Glomeromycota. Los AMF endotróficos son microbios ubicuos del suelo que constituyen un componente integral de los ecosistemas terrestres formando asociaciones simbióticas con los sistemas radicales de las plantas de más del 80% de todas las especies vegetales terrestres. En general, los simbiosites intercambian nutrientes, y los AMF obtienen carbono de la planta mientras le proveen a la planta con un abastecimiento adicional de fósforo. La simbiosis AM está asociada con un rango de beneficios adicionales para la planta incluyendo la adquisición de otros nutrientes minerales, tales como nitrógeno y resistencia a una variedad de estreses (Kapoor *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la entrada de fósforo a raíces micorrizadas puede ser de 3 a 5 veces más grande que en raíces no micorrizadas (Polle *et al.*, 2009). En consecuencia, la simbiosis AM es de tremenda significancia para la vida del planeta, tanto en ecosistemas naturales como agrícolas (Kapoor *et al.*, 2008).

Aunque la micropropagación es una técnica establecida para la propagación de plantas en condiciones *in vitro*, las plántulas obtenidas *in vitro* desarrollan ciertas características aberrantes debido a las condiciones ambientales controladas de los recipientes de cultivo tales como, alta humedad y baja intensidad lumínica. Como resultado de esto, las plántulas pueden no ser capaces de resistir un choque repentino de los cambios ambientales, mientras son transferidas de condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro* (Kapoor *et al.*, 2008). Algunas de estas deficiencias

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

incluyen: cambios en la morfología y fisiología de las hojas lo cual conduce a transpiración excesiva y desecación, baja actividad fotosintética, estomas no funcionales; hiperhidricidad, vitrificación y muy poca diferenciación vascular; reducción de la resistencia a enfermedades que hace que las plántulas sean blanco fácil ante el ataque de patógenos; así como también un sistema radical débil lo que altera la capacidad de absorción de nutrientes del suelo.

La transferencia de las plántulas cultivadas *in vitro* al invernadero es uno de los pasos más importantes en las adaptaciones estructurales y fisiológicas durante la preparación de las plántulas. Esta fase de aclimatación es el comienzo de la existencia autotrófica de la planta, con la iniciación de los procesos fisiológicos necesarios para su supervivencia. Durante la aclimatación, las plántulas deben incrementar la absorción de agua y minerales así como también su tasa fotosintética. Es bien sabido que los AMF incrementan el vigor de las plantas mediante el aumento de la absorción de agua y nutrientes minerales, especialmente fósforo. Más aún, los AMF pueden proteger a sus plantas hospedadoras de patógenos de la raíz y mitigar los efectos de las variaciones extremas de temperatura, pH y estrés hídrico (Kapoor *et al.*, 2008).

La inoculación de plántulas micropropagadas con AMF ayuda en el desarrollo de un sistema radical superior y más fuerte. Como consecuencia directa, se estimula el enraizamiento y crecimiento y por tanto la sobrevivencia al trasplante. La micorrización *in vitro* se refiere a la inoculación de AMF de las raíces de plántulas micropropagadas en crecimiento sobre medio de agar. La contaminación del inóculo, comportamiento de la planta hospedera *in vitro* y la naturaleza obligada de las endófitas son algunos de los principales obstáculos en el establecimiento de la simbiosis *in vitro*. Un método alternativo es la inoculación *ex vitro* o micorrización *in vivo*, en el que las esporas de los AMF son inoculadas a las plántulas micropropagadas después del trasplante a macetas (Kapoor *et al.*, 2008).

Aunque la relación entre los AMF y sus plantas hospederas es usualmente considerada como no específica, la relación es estrechamente controlada a niveles estructural y fisiológico. La falta de especificidad tiene por resultado una variación considerable en la respuesta simbiótica. Se conoce muy poco acerca de la especialización fisiológica y funcional de estos microorganismos del suelo. El conocimiento correspondiente a las relaciones específicas entre plantas y hongos es

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

importante para la utilización exitosa de los AMF bajo condiciones particulares (Kapoor *et al.*, 2008).

Ante este panorama, el estudio de la inoculación micorrícica y la respuesta específica para las especies de interés para este proyecto, *Litsea glaucescens* y *Quercus* spp. será necesario. También, se vuelve inevitable estudiar si en las plántulas micropropagadas aumenta la sobrevivencia en la fase de aclimatación, como resultado de la inoculación micorrícica.

Otro aspecto importante a considerar para el establecimiento *ex vitro* exitoso es el manejo de sustratos, fertilizantes e irrigación una vez que la plántula micropropagada ha de ser transferida a invernadero. Existen varias clasificaciones de los sustratos. La que está basada en sus propiedades los divide en dos grandes grupos: los sustratos químicamente inertes y los sustratos químicamente activos. Algunos ejemplos de los primeros son la arena granítica o silíceas, grava, roca volcánica, perlita, arcilla, entre otros; éstos actúan como soporte de la planta y no intervienen en el proceso de adsorción y fijación de los nutrientes. Ejemplos de sustratos químicamente activos son las turbas rubias y negras, corteza de pino, vermiculita, materiales ligno-celulósicos, etc.; sirven como soporte a la planta pero al mismo tiempo actúan como depósito de reserva de los nutrientes aportados mediante la fertilización. Se está dando importancia a las compostas y materiales de compostas como componentes en los sustratos comerciales debido a que estos materiales proveen nutrientes requeridos, capacidad de intercambio catiónico incrementada y mejoramiento en las capacidades de retención de agua. Otro material que está ganando interés es el estiércol composteado a través de gusanos. Estos materiales, llamados vermicompostas, están siendo usados como fertilizantes orgánicos, remediadores del suelo y como componentes de sustratos de crecimiento (Bachman y Metzger, 2008). Sin embargo, el efecto de la vermicomposta es diferente dependiendo de la especie a tratar.

Debido a que los sustratos de crecimiento comerciales basados en turba tienen capacidades de intercambio iónico bajas, la capacidad de retención de nutrientes es afectada por el volumen de irrigación (los nutrientes se lixivian), sin embargo este material fue el elegido para este proyecto debido a la accesibilidad a él mismo así como por la presencia de nutrientes, cuidando siempre el volumen de irrigación por dos motivos implícitos: evitar el desarrollo de hongos saprófitos y evitar la lixiviación de nutrientes antes mencionada.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Las actividades de conservación y restauración dentro de un ecosistema son necesarias cuando éste ha sido de alguna manera modificado bien sea por causas naturales o antropogénicas. Actualmente, una gran variedad de plantas se encuentran en peligro de extinción y es muy probable que la lista de especies siga creciendo y por tanto haya un descenso en la biodiversidad.

En el estado de Aguascalientes, existen zonas montañosas en las cuales se desarrollan varias especies forestales. Entre éstas destaca el laurel silvestre (*Litsea glaucescens*), que es considerada como una de las especies forestales no maderables más importantes de México y que sin embargo, ha sido declarado en peligro de extinción según la NOM-059-SEMARNAT-2001 debido a que ha sido sobreexplotada por sus usos medicinales, gastronómicos y religiosos durante el Domingo de Ramos. Por otra parte, las especies de encino (*Quercus* spp. L.) son las más abundantes e importantes en las áreas forestales de Aguascalientes. Pese a esto, los bosques de encino se han reducido de manera constante debido también a la sobreexplotación, así como por cambio de uso del suelo, problemas fitopatológicos y de plagas como el llamado “declinamiento de los encinos”.

Actualmente los programas de reforestación son indispensables para la conservación y uso racional y sostenible de los bosques. Sin embargo, para que los ecosistemas se conserven es vital que esta reforestación se haga con las propias especies nativas de la zona, respetando sus requerimientos particulares y su nicho ecológico. Esto hace necesaria la producción masiva en vivero de plantas de especies nativas con fines de reforestación.

Desafortunadamente esto no ha sido posible ni en el caso del laurel silvestre, ni con las especies de encino. Lo anterior debido a problemas para la obtención y germinación de las semillas (especialmente en el caso de los encinos, cuyas semillas no pueden almacenarse), así como en el establecimiento de las plantas propagadas en vivero.

Recientemente, la Biotecnología Vegetal ha surgido como una alternativa para la propagación masiva de especies de interés forestal. En este sentido ya se han establecido, en la propia Universidad Autónoma de Aguascalientes, protocolos eficientes para la propagación *in vitro* tanto del laurel silvestre, como de varias especies de encino nativas del Estado. Sin embargo, aún resta por resolver el problema que representa el establecimiento exitoso en el ambiente natural de las plantas generadas *in vitro*. Este es un aspecto que resulta indispensable resolver para poder finalmente aplicar esta tecnología a la producción masiva de plantas con fines de reforestación y restauración de ecosistemas.

La alta tasa de mortalidad y choque en la trasplantación son algunos de los principales problemas que limitan el éxito de la transferencia a campo. Mediante el uso de tecnología de micorrización, la sobrevivencia y el establecimiento de estas plantas generadas *in vitro* podría ser mejorada. Por lo anterior, este proyecto pretende solucionar el problema descrito y generar protocolos que permitan el establecimiento exitoso *ex vitro* de plantas de laurel silvestre y encino generadas *in vitro*.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Es posible establecer exitosamente *ex vitro* plantas de laurel silvestre (*Litsea glaucescens*) y encino (*Quercus* spp.) generadas *in vitro*. Sin embargo, para esto es necesario desarrollar protocolos que tomen en cuenta algunos requerimientos especiales de las especies forestales, siendo la simbiosis con hongos micorrícicos uno de los aspectos más importantes a considerar.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar protocolos eficientes para el establecimiento y desarrollo en suelo de plantas de laurel silvestre (*Litsea glaucescens*) y encino (*Quercus* spp.) generadas *in vitro*.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- i. Obtener brotes de *L. glaucescens* y *Quercus* spp. a través de los protocolos de propagación *in vitro* previamente desarrollados en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- ii. Desarrollar protocolos eficientes para el enraizamiento de los brotes obtenidos por cultivo *in vitro* de *L. glaucescens* y *Quercus* spp.
- iii. Estudiar el proceso de transferencia a suelo de las plántulas de *L. glaucescens* y *Quercus* spp. generadas, probando diferentes sustratos, regímenes de riego y fertilización, e inoculación con micorrizas, con el fin de encontrar las condiciones que lleven al máximo posible sus tasas de supervivencia y desarrollo *ex vitro*. Todo lo anterior a nivel de invernadero.
- iv. Analizar el establecimiento y desarrollo inicial en campo (Estación Biológica “Agua Zarca”) de algunas de las plantas generadas.

4. METODOLOGÍA

El proyecto se divide en cuatro etapas generales que consisten en: 1) la obtención de brotes generados *in vitro*, 2) enraizamiento de los brotes *in vitro*, 3) trasplante y aclimatación de plántulas, y 4) establecimiento inicial en suelo de las plantas generadas *in vitro* de especies de interés forestal (*Quercus* spp. y *Litsea glaucescens*) en la Estación Biológica de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

En la etapa 3 se probó la inoculación micorrícica desde dos diferentes enfoques. Durante el primero (enfoque 1) las plántulas obtenidas *in vitro* fueron trasplantadas y posteriormente inoculadas con micorrizas comerciales (*G. intraradices*) o con el inóculo bruto según el tratamiento, es decir, en el enfoque 1 la inoculación micorrícica se realizó *a posteriori* al trasplante. En el segundo enfoque (enfoque 2), se aislaron esporas de la micorriza comercial así como de muestras de suelo de bosques de encino a las cuales previamente se les realizó un análisis cualitativo para identificar infección micorrícica. Los aislados fueron utilizados para inocular las plántulas obtenidas *in vitro* durante un período de entre 3 a 5 días *a priori* al trasplante a maceta.

Durante las etapas 1, 2 y 3 del proyecto también se sembraron algunas semillas directamente en sustrato y se colocaron en invernadero, bajo dos diferentes tratamientos que se describen más adelante.

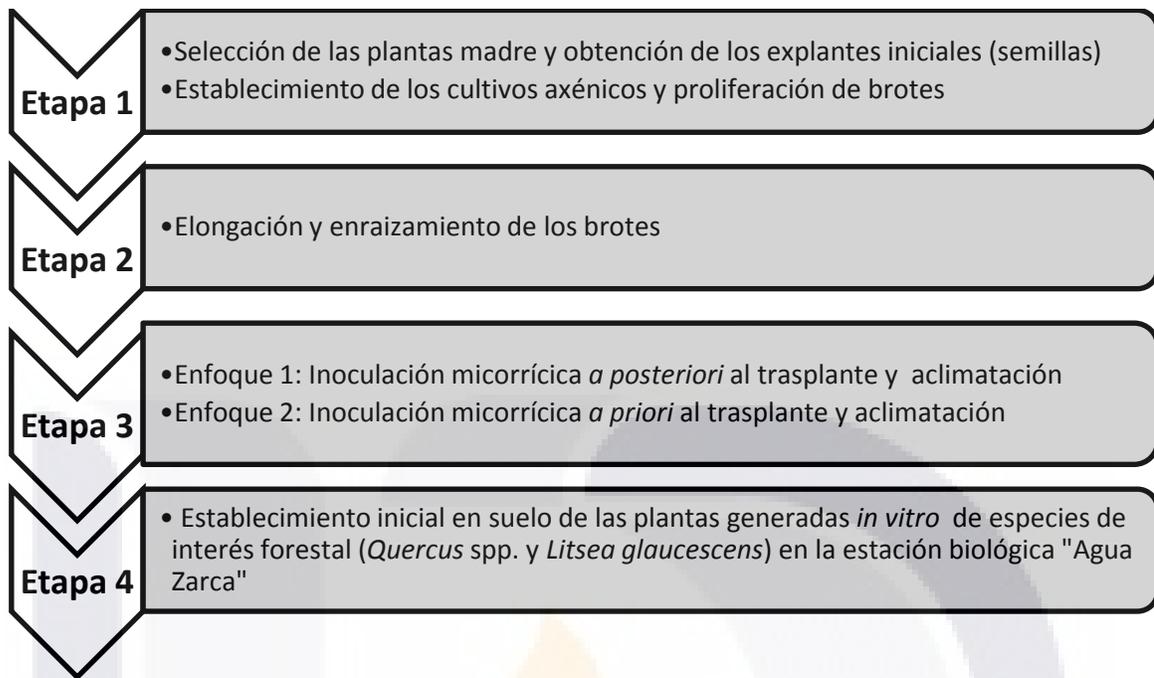


Figura 1. Esquema general de la metodología del proyecto de tesis “Establecimiento y desarrollo inicial en suelo de plantas generadas *in vitro* de especies de interés forestal (*Litsea glaucescens* y *Quercus* spp.)”.

4.1. SELECCIÓN DE LAS PLANTAS MADRE Y OBTENCIÓN DE EXPLANTES INICIALES

El sitio de estudio fue en las regiones montañosas del Estado de Aguascalientes, principalmente en los bosques de encino pertenecientes a la Sierra Fría y la Sierra del Laurel. En el sitio de estudio domina una mezcla de *Quercus* spp. entre las que se pudieron identificar las especies *Q. eduardii*, *Q. rugosa*, *Q. resinosa*, *Q. grisea*, *Q. laeta*, *Q. castanea*, *Q. potosina* y *Q. microphylla*. Estos bosques de encino son hábitat también de otras especies, entre las cuales se encuentra el laurel silvestre, *L. glaucescens*.

Se hicieron varios recorridos en distintas fechas y colectaron bellotas de los especímenes maduros de *Quercus* spp. debido a que los tiempos de floración y producción de bellotas varían

dependiendo de la especie y de otras condiciones como la precipitación pluvial. Las bellotas colectadas se llevaron al laboratorio, se almacenaron en refrigeración a 4°C y se procesaron en un período máximo de siete días a partir de su colecta para evitar su desecación y deterioro.

Asimismo se hicieron varios recorridos y se colectaron frutos inmaduros de *L. glaucescens*, los cuales se llevaron al laboratorio, se limpiaron con agua corriente, secaron y almacenaron en refrigeración a 4°C para esperar la maduración del fruto; este tiempo de maduración varió dependiendo del estado en que fueron colectadas las muestras pero en general fue de tres a cuatro semanas. Una vez maduros los frutos, se les extrajeron las semillas. Éstas fueron lavadas con agua corriente y detergente Dermoclean® (n- alquil metil bencil cloruro de amonio), secadas y posteriormente almacenadas nuevamente en refrigeración, en contacto con fungicida Captan (n-triclorometil -4-ciclohexano-1,2-dicarboximida).

Los meses de colecta fueron de los días finales de junio a noviembre en la temporada de 2009 y de enero a octubre en la temporada 2010.

Cuadro 2. Puntos de colecta para laurel silvestre *L. glaucescens* (al centro de las poblaciones)

Lugar	Coordenadas*		Altura# (msnm)
	O	N	
Barranca Verde	102° 42'13.01"	22° 05'19.49"	2390 – 2460
Barranca Los Alamitos	102° 42'53.38"	21° 43'53.38"	2260 – 2340
Barranca Oscura	102° 38'27.89"	21° 46'41.14"	2250 - 2420

* O: Oeste; N: Norte

msnm: metros sobre el nivel del mar

Cuadro 3. Puntos de colecta de encinos *Quercus* spp.

Especie colectada	Lugar	Coordenadas*		Altura# (msnm)
		O	N	
<i>Q. eduardii</i>	Mesa Montoro	102° 34' 27.10"	22° 00' 28.27"	2347
<i>Q. eduardii</i>	Mesa Montoro	102° 34' 26.56"	22° 00' 28.85"	2346
<i>Q. eduardii</i>	Milpillas	102° 33' 48.36"	21° 57' 40.70"	2147
<i>Q. eduardii</i>	Milpillas	102° 34' 23.53"	22° 00' 22.58"	2204
<i>Q. eduardii</i>	Milpillas	102° 33' 48.57"	21° 57' 35.99"	2351
<i>Q. eduardii</i>	Picacho	102° 25' 07.9"	21° 53' 14.6"	2070
<i>Q. eduardii</i>	Mesa Montoro	102° 34' 26.5"	22° 00' 28"	2346
<i>Q. eduardii</i>	Mesa Montoro	102° 33' 55"	22° 00' 09.4"	2376
<i>Q. resinosa</i>	El Temazcal	102° 44' 32.05"	22° 01' 18"	2168
<i>Q. resinosa</i>	Picacho	102° 25' 08.5"	21° 53' 16.9"	2060
<i>Q. resinosa</i>	Sierra de Huijolotes	102° 31' 27.2"	21° 48' 05"	2036
<i>Q. rugosa</i>	Barranca Piletas	102° 44' 09.37"	22° 03' 51.60"	2511
<i>Q. rugosa</i>	Barranca Los Alamos	102° 42' 53.55"	21° 44' 02.80"	2308
<i>Q. rugosa</i>	Barranca Oscura	102° 38' 24.9"	21° 46' 41.20"	2252
<i>Q. rugosa</i>	Los Alisos	102° 42' 52.1"	21° 44' 00.90"	2313
<i>Q. laeta</i>	Barranca Oscura	102° 39' 02.6"	21° 47' 56.85"	2147
<i>Q. laeta</i>	Barranca Oscura	102° 38' 13.5"	21° 46' 37.9"	2277
<i>Q. grisea</i>	Mesa Montoro	102° 34' 21.05"	22° 00' 21.24"	2355
<i>Q. castanea</i>	Barranca Verde	102° 46' 56.4"	22° 03' 54.10"	2510
<i>Q. potosina</i>	Mesa Montoro	102° 33' 50.3"	22° 01' 48.5"	2320
<i>Q. potosina</i>	Mesa Montoro	102° 33' 37.9"	22° 01' 32.2"	2323

* O: Oeste; N: Norte

msnm: metros sobre el nivel del mar

4.2. ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS AXÉNICOS Y PROLIFERACIÓN DE BROTES

4.2.1. Desinfección de las bellotas de encinos (*Quercus* spp.)

Las bellotas de las diferentes especies de encino colectadas en campo fueron desinfectadas para poder ser inoculadas *in vitro* y así establecer los cultivos axénicos para las siguientes etapas del proyecto. El siguiente protocolo de desinfección (ver figura 2) se basa en lavados y tratamientos con etanol y blanqueador comercial Cloralex® cuyo ingrediente activo es hipoclorito de sodio. Las bellotas colectadas fueron seleccionadas manualmente excluyendo las que tenían un estado de maduración avanzado, alta desecación o bien se encontraban con heridas causadas por insectos o por manipulación durante el muestreo; antes de comenzar el protocolo de desinfección, a las bellotas se les retiró la cúpula.

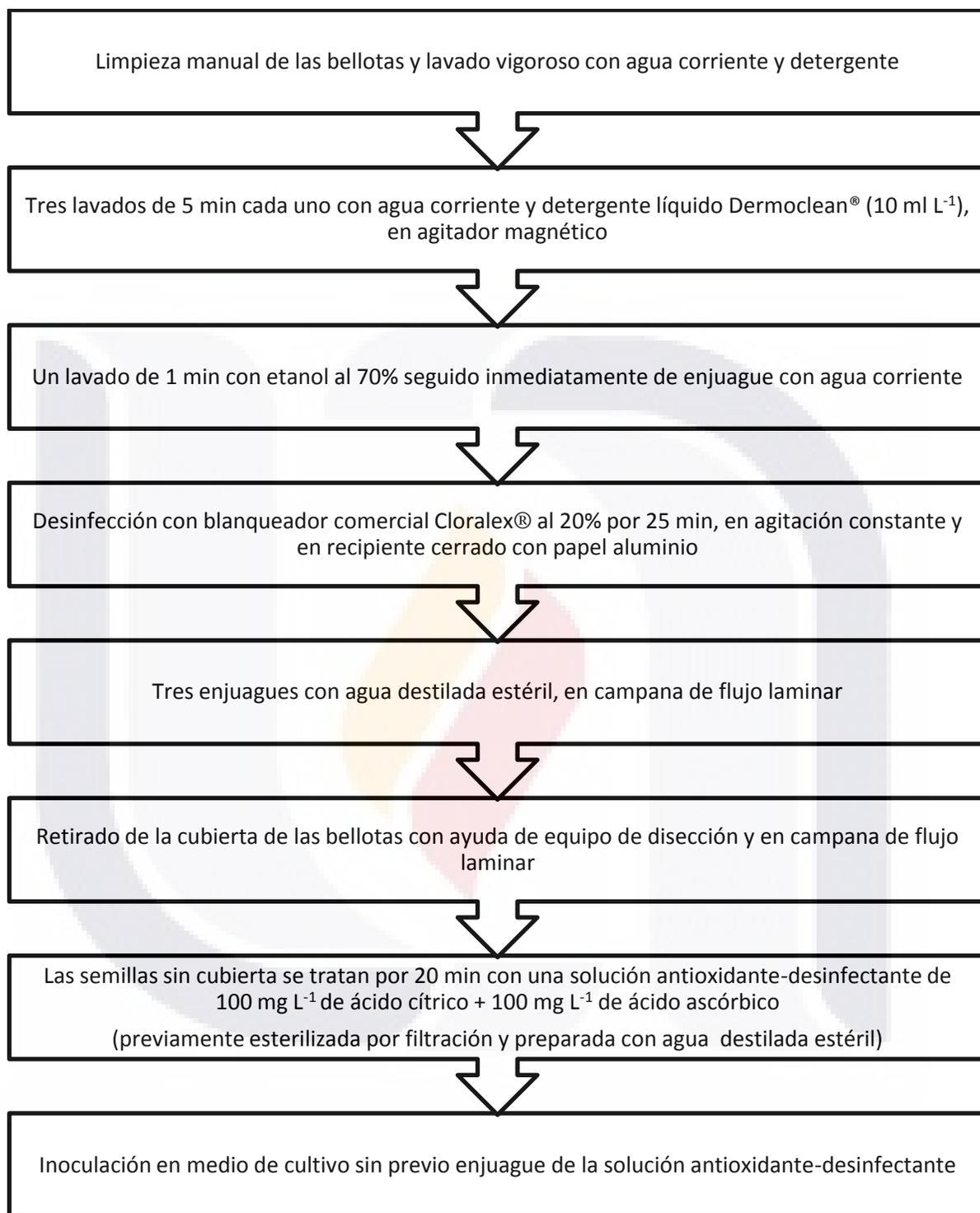


Figura 2. Protocolo de desinfección de bellotas de *Quercus* spp.

4.2.2. Germinación *in vitro* de bellotas y proliferación de brotes de *Quercus* spp.

Las bellotas desinfectadas fueron inoculadas en medio de Murashige y Skoog (MS), pH 5.7, adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar y 4 mg L⁻¹ de benciladenina (BA) como regulador de crecimiento vegetal para inducir la brotación múltiple, esterilizado en autoclave a 121°C por 20 min. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad por tres semanas; después se colocaron en un cuarto de cultivo a 70 μmol m⁻² s⁻¹ con fotoperiodo 16/8 horas (luz/ oscuridad) y a 25°C, por 45 a 60 días, tiempo en el cual los brotes alcanzaron tallas de 2 a 4 cm para poder ser utilizados como explantes durante el enraizamiento.

4.2.3. Desarrollo del método de desinfección de las semillas de *L. glaucescens*

Como se mencionó anteriormente, las semillas se obtuvieron de los frutos maduros, mediante separación manual. El indicativo de la madurez del fruto fue el cambio de color de verde a negruzco así como también el cambio en la consistencia del mismo, de turgente a blanda.

Una vez obtenidos los explantes iniciales, se procedió a probar el efecto de la concentración del agente desinfectante, el tiempo de exposición al mismo y el uso de agentes fungicidas con los tratamientos que se describen a continuación:

- Tratamiento 1. Los explantes se lavaron con Dermoclean (10 ml L⁻¹) y agua corriente, tres veces, en agitación vigorosa, seguido de un lavado con etanol al 70% por 1 min y enjuague con agua corriente inmediato. Se desinfectaron con blanqueador comercial Cloralex® al 25% por 25 min, en agitación constante y con el frasco sellado. En campana de flujo laminar, se enjuagaron con agua destilada estéril, tres veces.
- Tratamiento 2. Los explantes fueron inmersos en una solución fungicida por 24 horas y posteriormente lavados con la misma solución de Dermoclean, pero cada lavado se realizó por 10 min. El resto del protocolo no sufrió modificaciones.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Tratamiento 3. Los explantes fueron inmersos en una solución fungicida en agitación vigorosa por 24 horas. Se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con Dermoclean, seguido de un lavado con etanol al 70% por 1 min y enjuague con agua corriente inmediato. Se desinfectaron con blanqueador comercial Cloralex® al 50% por 25 min, en agitación constante y con el frasco sellado. En campana de flujo laminar, se enjuagaron con agua destilada estéril, tres veces.
 - Tratamiento 4. A partir de este tratamiento hasta el seis, los lavados iniciales se realizaron como el anterior hasta la adición del desinfectante Cloralex® que para este tratamiento se aplicó al 100% por 25 min con agitación constante y aplicando 4 ciclos de extracción de aire con bomba de vacío de 30 seg cada uno, en campana de flujo laminar. Los explantes se enjuagaron después con agua destilada estéril, tres veces.
 - Tratamiento 5. Para la desinfección se utilizó Cloralex® al 80% por 40 min y aplicando 4 ciclos de extracción de aire con bomba de vacío de 30 s cada uno, en campana de flujo laminar. Los explantes se enjuagaron después con agua destilada estéril, tres veces.
 - Tratamiento 6. Para la desinfección se utilizó Cloralex® al 100% por 15 min y aplicando 4 ciclos de extracción de aire con bomba de vacío de 30 s cada uno, en campana de flujo laminar. Los explantes se enjuagaron después con agua destilada estéril, tres veces.
 - Tratamiento 7. Los explantes fueron lavados por 15 min con una solución con Dermoclean (10 ml L⁻¹) y luego en Cloralex® al 100% por 15 min. En campana de flujo laminar, con equipo de disección se les retiró la testa y se sometieron a desinfección con una solución de Cloralex® al 10% en agitación vigorosa por 40 min en un vaso de precipitados sellado. Los explantes se enjuagaron después con agua destilada estéril, tres veces.
 - Tratamiento 8. Se realizaron tres lavados de 15 min cada uno con una solución de Dermoclean (10 ml L⁻¹) en agitación vigorosa, un lavado con etanol al 70% por 1 min seguido de la desinfección con Cloralex® al 50% por 50 min en vaso de precipitado sellado y en agitación constante. En campana de flujo laminar, tres enjuagues con agua destilada estéril.
 - Tratamiento 9. Los explantes fueron tratados como se muestra en la siguiente figura. Este tratamiento fue el que mostró mejores resultados por lo que se utilizó como protocolo de desinfección para etapas posteriores del proyecto.

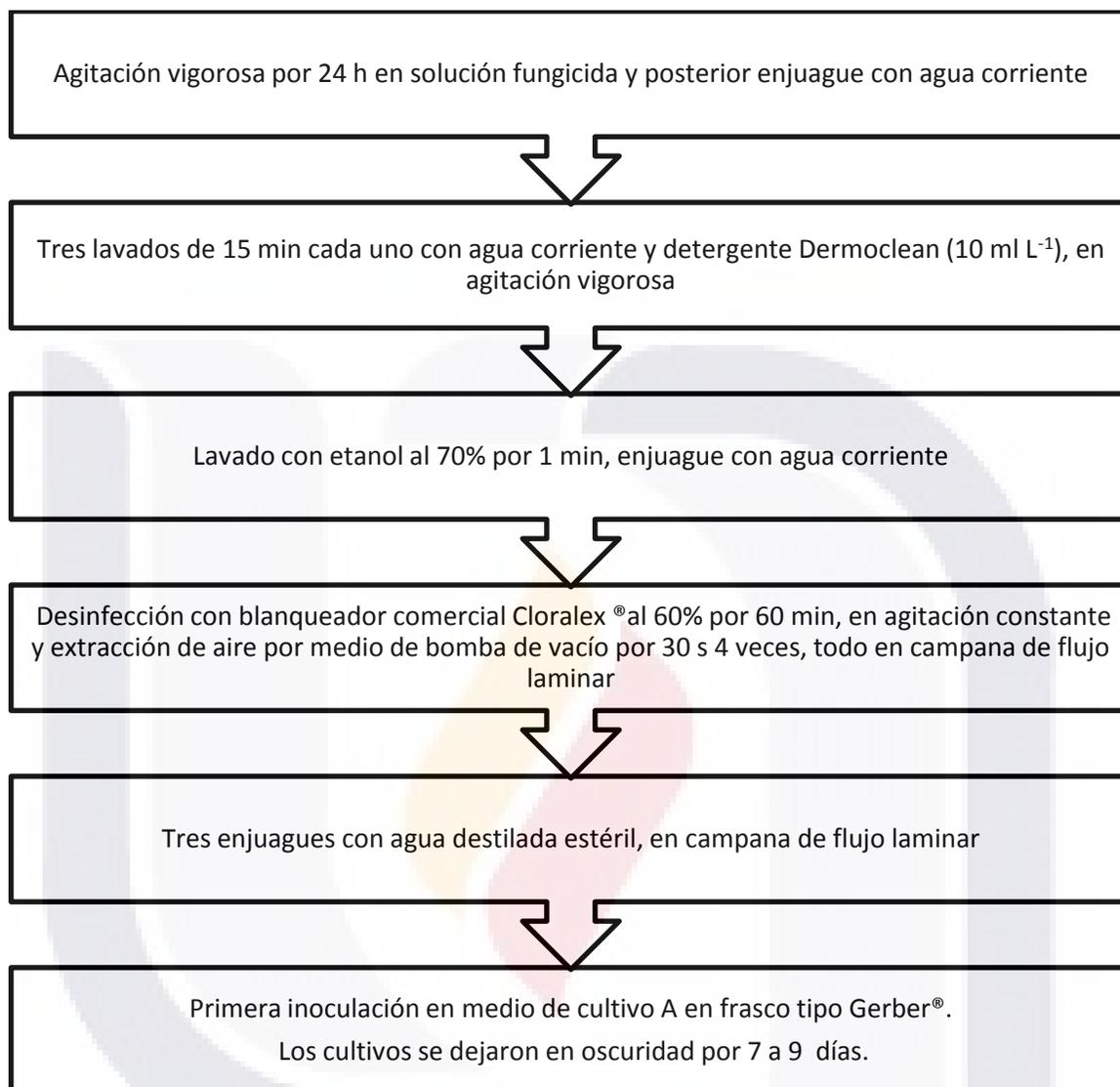


Figura 3. Tratamiento de desinfección 9 aplicado a las semillas de *L. glaucescens*. Este tratamiento se tomó como protocolo de desinfección para las etapas siguientes del proyecto.

Seguido a cada tratamiento de desinfección, se realizó la primera inoculación de los explantes en medio de cultivo medio MS, pH 5.7, adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar y 4 g L⁻¹ de carbón activado (denominado como medio de cultivo A para efectos de simplicidad) y los cultivos se dejaron en oscuridad de 7 a 9 días.

4.2.4. Germinación *in vitro* de semillas y proliferación de brotes de *L. glaucescens*

A los explantes que después de someterlos al tratamiento de desinfección que mostró mejores resultados y que tras 7 a 9 días en oscuridad no se contaminaron, en campana de flujo laminar y con ayuda de equipo de disección se les retiró la testa, se colocaron en una solución antioxidante/desinfectante esterilizada por filtración (100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico + 100 mg L⁻¹ de ácido cítrico) por 20 min y se inocularon en dos diferentes medios de cultivo, denominados para este proyecto como A y B en frasco de vidrio de 1 L.

El medio A consistió en medio MS, pH 5.7, adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar y 4 g L⁻¹ de carbón activado (CA); el medio B consistió en MS, pH 5.7, adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar, 1 mg L⁻¹ de benciladenina, 1 mg L⁻¹ de cinetina y 1 mg L⁻¹ de PVP. Éste último fue probado esperando que la respuesta fuera la formación de embriones. Los cultivos se colocaron en un cuarto de cultivo a 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con fotoperiodo 16/8 horas (luz/oscuridad) y a 25°C por 22 días. Los medios de cultivo se esterilizaron a 121°C por 20 min.

Posteriormente y en base a los resultados negativos para el medio B, sólo se continuó utilizando el medio A. Dado que el medio de cultivo A no contiene reguladores de crecimiento vegetal, sólo se obtuvo un brote por explante por lo que la inducción de brotes se realizó cortando el brote apical para lograr la estimulación de las yemas axilares, a partir de los cuales se logró el crecimiento en un período de 30 a 45 días de dichos brotes, que fueron cortados y utilizados como explantes para la etapa de enraizamiento.

4.3. ELONGACIÓN Y ENRAIZAMIENTO DE LOS BROTES

4.3.1. Inducción del enraizamiento de brotes de *Quercus* spp.

Los brotes de *Quercus* spp. obtenidos *in vitro* se dejaron en fotoperíodo 16/8 horas (luz/oscuridad) hasta que las plántulas tuvieran hoja y una vez que alcanzaran de 2 a 4 cm de alto fueron cortados para inducir el enraizamiento. Al momento del corte, se cuidó el no disturbar la base de los brotes para permitir que los más pequeños siguieran creciendo y pudieran ser utilizados posteriormente.

Los brotes cortados fueron inmediatamente inoculados en medio MS a la mitad de fuerza ($MS_{\frac{1}{2}}$) adicionado con 2.5 g L^{-1} de Phytigel y 10 mg L^{-1} de Ácido indolbutírico (IBA) como regulador del crecimiento vegetal; el tiempo de exposición al IBA fue diferente dependiendo de la especie y fue seguido por la transferencia a medio $MS_{\frac{1}{2}}$ adicionado con 2.5 g L^{-1} de Phytigel en recipiente con tapa para intercambio gaseoso. Los medios de cultivo se esterilizaron a 121°C por 20 min.

Para *Q. eduardii*, *Q. resinosa* y *Quercus sp.* el tiempo de exposición al medio con IBA fue de 48 horas, mientras que para *Q. rugosa* y *Q. grisea* fue de 168 horas.

Los cultivos se colocaron en un cuarto de cultivo a $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con fotoperíodo 16/8 horas (luz/ oscuridad) y a 25°C hasta la formación de raíces (este período pudo comprender de 3 a 4 semanas).

4.3.2. Desarrollo del método de inducción del enraizamiento de brotes de *L. glaucescens*

Los brotes cortados fueron inmediatamente inoculados en medio MS_½ adicionado con 2.5 g L⁻¹ de Phytigel con regulador del crecimiento vegetal, variando la concentración y el tiempo de exposición a dicho regulador con los tratamientos que se describen a continuación:

- Tratamiento 1. Los brotes fueron primeramente inoculados en medio MS, pH 5.7 adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 3 g L⁻¹ de Phytigel y 0.5 mg L⁻¹ de Ácido naftalenacético (ANA) durante un período de 15 días.
- Tratamiento 2. Los brotes fueron primeramente inoculados en medio MS, pH 5.7 adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 3 g L⁻¹ de Phytigel, 1 g L⁻¹ PVP y se probaron tres diferentes concentraciones de IBA durante un período de 7 días.
- Tratamiento 3. Los brotes fueron primeramente inoculados en medio MS, pH 5.7 adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 3 g L⁻¹ de Phytigel, 1 g L⁻¹ Polivinilpirrolidona (PVP) y con tres diferentes concentraciones de IBA durante un período de 15 días.
- Tratamiento 4. Los brotes fueron primeramente inoculados en medio MS, pH 5.7 adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 3 g L⁻¹ de Phytigel, 1 g L⁻¹ Polivinilpirrolidona (PVP) y con tres diferentes concentraciones de IBA durante un período de 30 días.
- Tratamiento 5. Los brotes fueron primeramente inoculados en medio MS, pH 5.7 adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 3 g L⁻¹ de Phytigel, 1 g L⁻¹ Polivinilpirrolidona (PVP) y con tres diferentes concentraciones de IBA durante un período de 15 días.
- Tratamiento 6. Los brotes fueron primeramente inoculados en medio MS, pH 5.7 adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 3 g L⁻¹ de Phytigel, 1 g L⁻¹ Polivinilpirrolidona (PVP) y con tres diferentes concentraciones de IBA durante un período de 7 días.

Cuadro 4. Resumen de los tratamientos aplicados a brotes de laurel silvestre para inducir enraizamiento

Tratamiento	RCV [#]	Concentración (mg L ⁻¹)	Tiempo de exposición al tratamiento [*]
1	ANA	0.5	15 días
2	IBA	0.5	7 días
		1.0	
3	IBA	1.5	15 días
		2.0	
		2.5	
4	IBA	0.5	30 días
		1.0	
		1.5	
5	IBA	1.5	15 días
		2.0	
		2.5	
6	IBA	5.0	7 días
		10.0	
		20.0	

[#] RCV: regulador de crecimiento vegetal

^{*} Se refiere al tiempo de exposición al RCV contenido en el medio de cultivo donde los brotes fueron inoculados primeramente.

Todos los brotes después de la exposición al regulador de crecimiento vegetal (RCV) fueron transferidos a medio MS_½ adicionado con 3 g L⁻¹ de Phytigel y 2 g L⁻¹ de CA en recipiente con tapa para intercambio gaseoso. Los cultivos se colocaron en un cuarto de cultivo a 70 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperiodo 16/8 horas (luz/ oscuridad) a 25 °C hasta la formación de raíces. Los medios de cultivo se esterilizaron a 121°C por 20 min.

4.4. TRANSFERENCIA DE PLÁNTULAS A MACETA E INOCULACIÓN MICORRÍCICA

4.4.1. Transferencia de plántulas a macetas y aclimatación

A los recipientes conteniendo las plántulas ya enraizadas se les quitó el vitafilm de la tapa, para iniciar la aclimatación, se destaparon y volvieron a cerrar por tres días. Pasado este período de tiempo, las plántulas se retiraron del medio de cultivo y se enjuagaron con agua corriente para eliminar restos del mismo.

4.4.2. Efecto de la inoculación micorrícica para el enfoque 1

Las plántulas limpias se transfirieron inmediatamente a macetas bajo el siguiente esquema de tratamientos para *Quercus* spp.:

- Tratamiento 1. Las plántulas fueron transferidas a macetas que contenían como sustrato turba.
- Tratamiento 2. Las plántulas fueron transferidas a macetas que contenían como sustrato turba con el inóculo bruto (suelo de bosques de encino) en proporción 1:1.
- Tratamiento 3. Las plántulas fueron transferidas a macetas que contenían como sustrato turba con el inóculo de *Glomus intraradices*. Este inóculo fue una micorriza comercial en polvo que se aplicó de la siguiente manera: la turba se removió para el espacio en el cual se colocaron las plántulas; en este espacio se aplicó el inóculo y enseguida se transfirieron las plántulas.
- Tratamiento 4. Las plántulas se transfirieron a macetas conteniendo únicamente suelo de bosques de encino.

Y para el caso de *L. glaucescens* los tratamientos fueron los siguientes:

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Tratamiento 1. Las plántulas fueron transferidas a macetas, las cuales contenían como sustrato turba.
 - Tratamiento 2. Las plántulas fueron transferidas a macetas que contenían como sustrato turba con el inóculo de *Glomus intraradices* que se aplicó de la siguiente manera: la turba se removió para el espacio en el cual se colocaron las plántulas; en este espacio se aplicó el inóculo y enseguida se transfirieron las plántulas.

Todas las macetas utilizadas fueron de 30 cm de diámetro y 10 cm de profundidad. Las macetas fueron cubiertas con bolsas plásticas cerradas y puestas en la cámara de aclimatación por 7 días. Después de este tiempo, las bolsas se abrieron gradualmente fuera de la cámara de aclimatación. Se realizaron los riegos primeramente cada tercer día y después cada 7 días.

El inóculo micorrízico bruto se obtuvo de los suelos de bosque de encino en los que existen *Quercus* spp. y *L. glaucescens* preferentemente en las áreas más húmedas que favorecen la presencia de hongos micorrízicos.

Se evaluó el porcentaje de supervivencia de las plántulas trasplantadas, así como el crecimiento relativo de las mismas en un período de 28 días a intervalos de 7 días cada uno. El crecimiento relativo se calculó relacionando el tamaño final de la plántula entre el tamaño inicial, de manera que cualquier valor superior a 1.00 indicó que hubo crecimiento respecto al tamaño cuando se trasplantaron.

4.4.3. Efecto de la inoculación micorrícica para el enfoque 2

Las plántulas limpias se colocaron en contacto con un aislado de esporas diferente para cada uno de los tratamientos que se describen más adelante, por un período de entre 3 a 5 días después del cual se transfirieron a macetas con turba.

El aislado de esporas se obtuvo de aquellos suelos de bosque de encino en los cuales al realizarse una prueba cualitativa de determinación de infección micorrícica en raíces resultó positiva, así como también de la muestra comercial de *G. intraradices*. Los suelos posteriormente fueron sometidos a un protocolo de aislamiento de esporas por tamizado y flotación en agua; en el aislado obtenido se realizó el conteo de esporas para cada muestra de suelo seleccionada y se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta su uso para la inoculación micorrícica.

Se realizaron 4 tratamientos para *Quercus spp*:

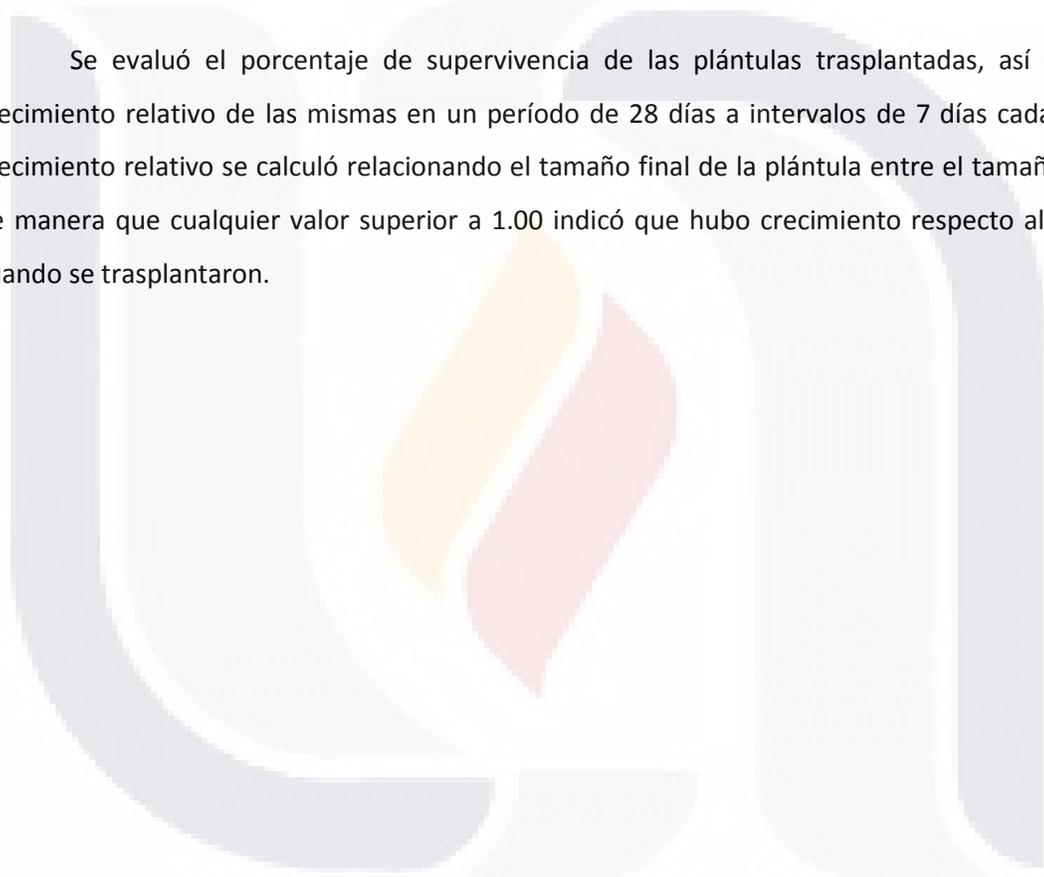
- Tratamiento 1: Control (agua destilada estéril).
- Tratamiento 2. Aislado de esporas de una muestra de suelo donde existía crecimiento de laurel.
- Tratamiento 3. Aislado de esporas de una muestra de suelo donde existía crecimiento de encinos.
- Tratamiento 4. Aislado de la muestra comercial de micorrizas *G. intraradices*.

Para el caso de *L. glaucescens*, las plántulas libres de medio de cultivo se pusieron en contacto bajo los siguientes tratamientos:

- Tratamiento 1: Control (agua destilada estéril).
- Tratamiento 2. Aislado de esporas de una muestra de suelo donde existía crecimiento de laurel.
- Tratamiento 3. Aislado de la muestra de micorrizas *G. intraradices*.

Todas las macetas utilizadas fueron de 30 cm de diámetro y 10 cm de profundidad. Las plántulas trasplantadas se cubrieron con frascos de vidrio invertidos y se dejaron en cámara de aclimatación por 7 días, después de los cuales se colocaron fuera de la cámara pero dentro del laboratorio por otros 7 días en los cuales diariamente el frasco de vidrio se retiró por 1 hora; pasado este período se colocaron fuera del laboratorio en un lugar donde no haya variaciones grandes de temperatura y luz volviendo a dejar el frasco de vidrio por 7 días, después de los cuales se retira diariamente 1 hora el frasco hasta que la planta quede completamente aclimatada.

Se evaluó el porcentaje de supervivencia de las plántulas trasplantadas, así como el crecimiento relativo de las mismas en un período de 28 días a intervalos de 7 días cada uno. El crecimiento relativo se calculó relacionando el tamaño final de la plántula entre el tamaño inicial, de manera que cualquier valor superior a 1.00 indicó que hubo crecimiento respecto al tamaño cuando se trasplantaron.



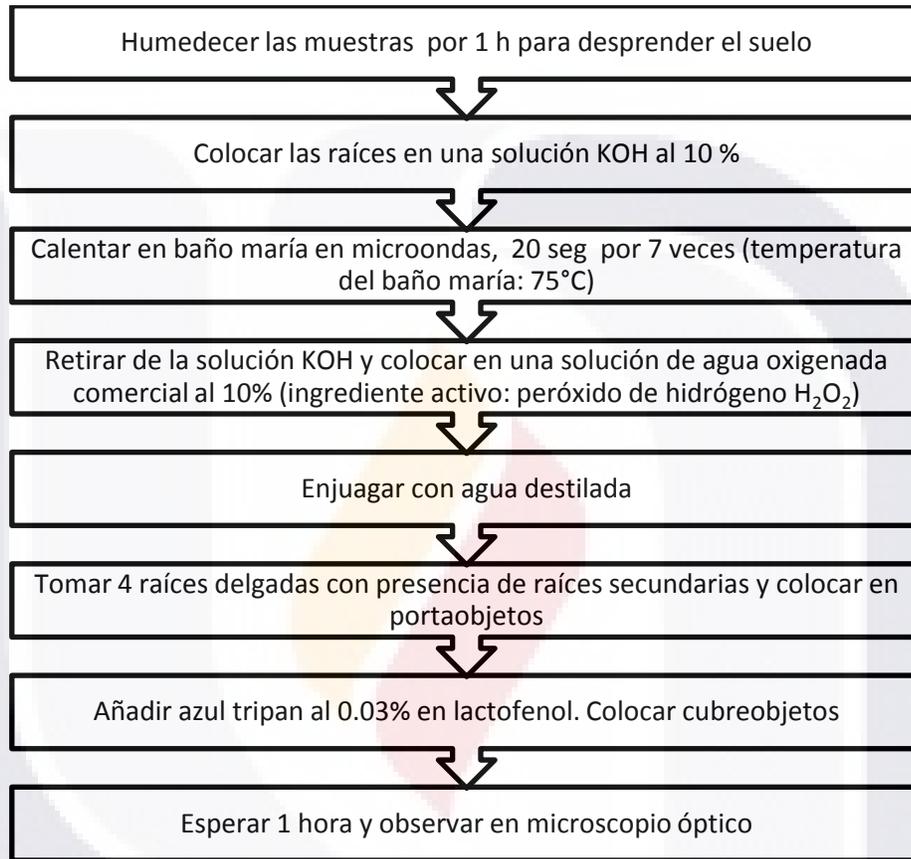


Figura 4. Protocolo para la determinación cualitativa de infección micorrízica en raíces de muestras de suelo.

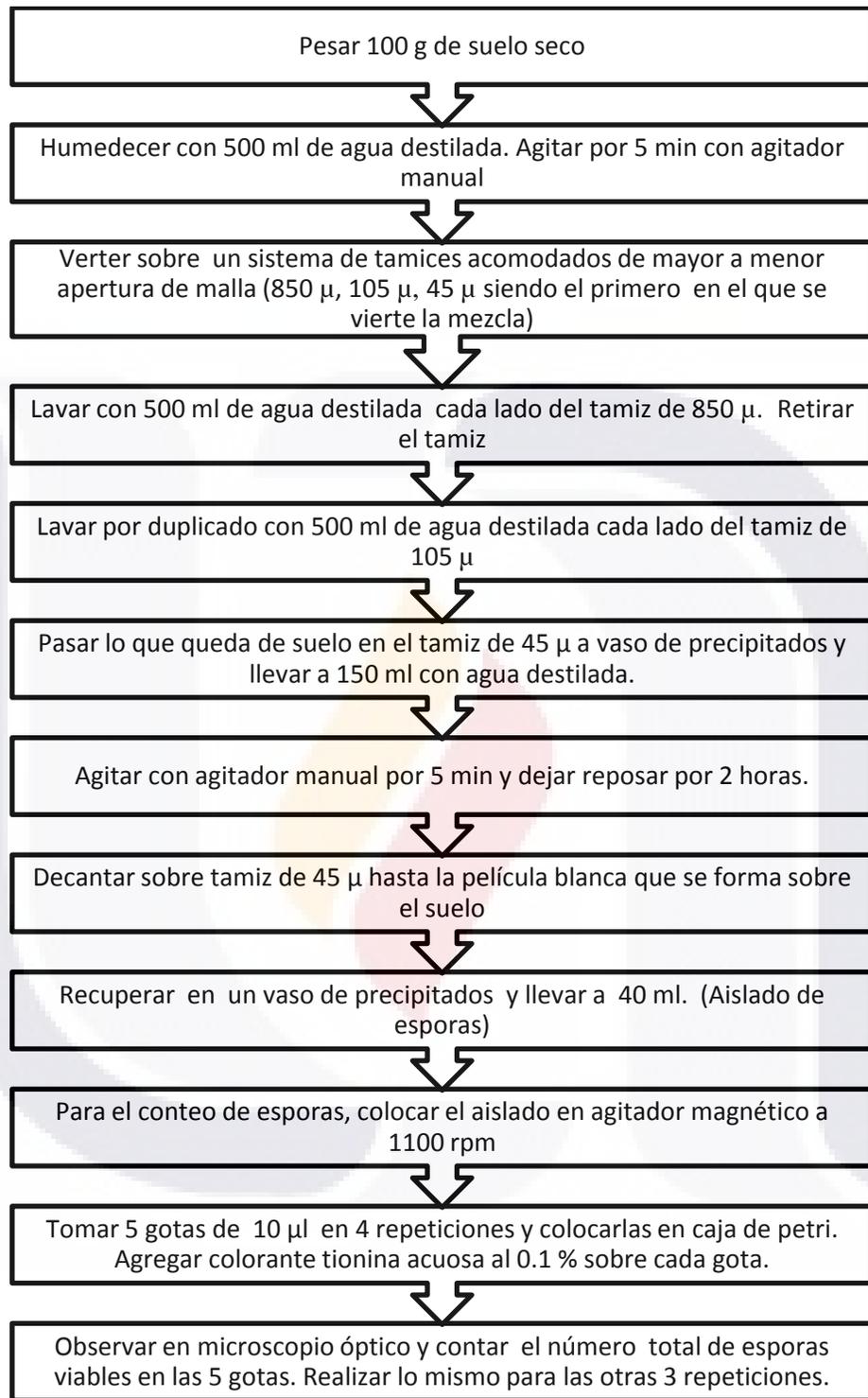


Figura 5. Protocolo para el aislamiento y conteo de esporas

Para calcular el número de esporas por gramo de suelo se aplicó la siguiente relación:

$$\text{Esporas/g de suelo} = \frac{(40000 \mu\text{l})(\text{conteo de esporas})(1 \text{ g})}{(50 \mu\text{l})(100 \text{ g})}$$

4.5. GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *QUERCUS* SPP. Y *L. GLAUDESCENS* EN INVERNADERO

Las semillas de las especies *Q. eduardii*, *Q. resinosa*, *Q. potosina* y *L. glaucescens* se colocaron en dos diferentes sustratos y una vez sembradas fueron colocadas directamente en invernadero. Estos tratamientos *in vivo* consistieron en lo siguiente:

- Tratamiento 1. Control; se utilizó como sustrato turba.
- Tratamiento 2. Se utilizó como sustrato turba y al momento de sembrar las semillas se esparció el polvo de la micorriza comercial *G. intraradices*.

4.6. ESTABLECIMIENTO Y DESARROLLO INICIAL EN CAMPO EN LA ESTACIÓN BIOLÓGICA “AGUA ZARCA”

Las plantas aclimatadas se llevaron a la Estación Biológica “Agua Zarca” y se establecieron en suelo. Se registró el porcentaje de supervivencia al trasplante. La Estación Biológica Agua Zarca se localiza dentro de la Provincia Fisiográfica de la Sierra Madre Occidental, a 75 km al noroeste de la ciudad de Aguascalientes después de la población denominada Potrero de los López. Su altitud oscila entre los 2,200 y los 2,350 metros sobre el nivel del mar entre las coordenadas 22° 05’30” y 22° 06’00” de Latitud Norte y los 102° 34’30” y 102° 33’00” de Longitud Oeste. La vegetación predominante está representada por el bosque de encino con presencia de manzanita, yucas, matorral espinoso y pastizal.

5. ANÁLISIS DE DATOS

Para este proyecto, las respuestas que se evaluaron en cada etapa fueron:

- Etapa 1:
 - Porcentaje de desinfección y contaminación
 - Porcentaje de germinación y número de brotes por explante (\pm error estándar)
- Etapa 2: Porcentaje de enraizamiento, número de raíces por explante (\pm error estándar) y longitud de la raíz (\pm error estándar)
- Etapa 3:
 - Enfoque 1: porcentaje de supervivencia al trasplante y crecimiento relativo
 - Enfoque 2: porcentaje de supervivencia al trasplante y crecimiento relativo
- Etapa 4: Porcentaje de supervivencia al establecimiento inicial en suelo

Estos valores se obtuvieron mediante el programa Microsoft Office Excel 2007, y son presentados a manera de cuadro.

6. RESULTADOS

6.1. SELECCIÓN DE LA PLANTA MADRE Y OBTENCIÓN DE LOS EXPLANTES INICIALES

Para la colecta, la localización y caracterización de las poblaciones tanto de *Quercus* spp. como de *L. glaucescens* se conocían gracias a proyectos anteriores al presente, desarrollados también en la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Cuadros 2 y 3). Debido a esto, los recorridos y visitas a las zonas montañosas del Estado de Aguascalientes, estuvieron orientados hacia aquellos lugares en donde era posible encontrar los explantes iniciales. Es importante mencionar, que algunos sitios representaron una dificultad por la inaccesibilidad, principalmente en lo que se refiere a laurel silvestre, ya que esta especie se encuentra en barrancas; aunado a lo anterior, debido al saqueo que se tiene por sus usos, se observó que la mayoría de los individuos tienen un tamaño menor a lo reportado y existen pocos en estado arbóreo. En cuanto a los encinos, si bien fue posible localizar varias especies, sólo algunas de ellas produjeron bellotas y en algunos casos, muchas de las bellotas presentaban daño por picaduras de insectos.

Se colectaron bellotas de las especies de encino *Q. eduardii*, *Q. rugosa*, *Q. resinosa*, *Q. laeta*, *Q. grisea*, *Q. castanea* y *Q. potosina*, así como también frutos inmaduros de laurel silvestre *L. glaucescens*, a partir de los cuales se obtuvieron los explantes iniciales que en todos los casos fueron semillas, con la metodología anteriormente descrita (Figuras 7 y 9)

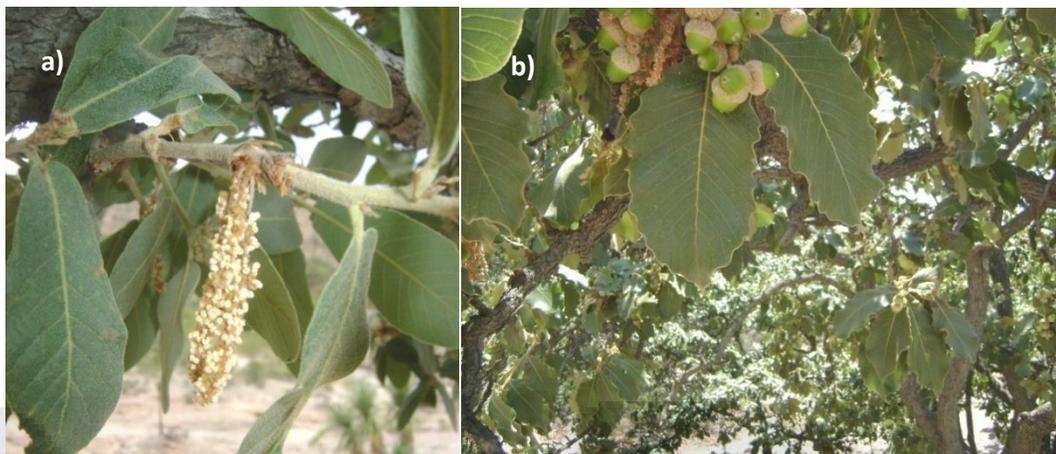


Figura 6. a) Floración de la especie *Q. resinosa* en campo. b) Algunas de las plantas madre de encinos seleccionadas.

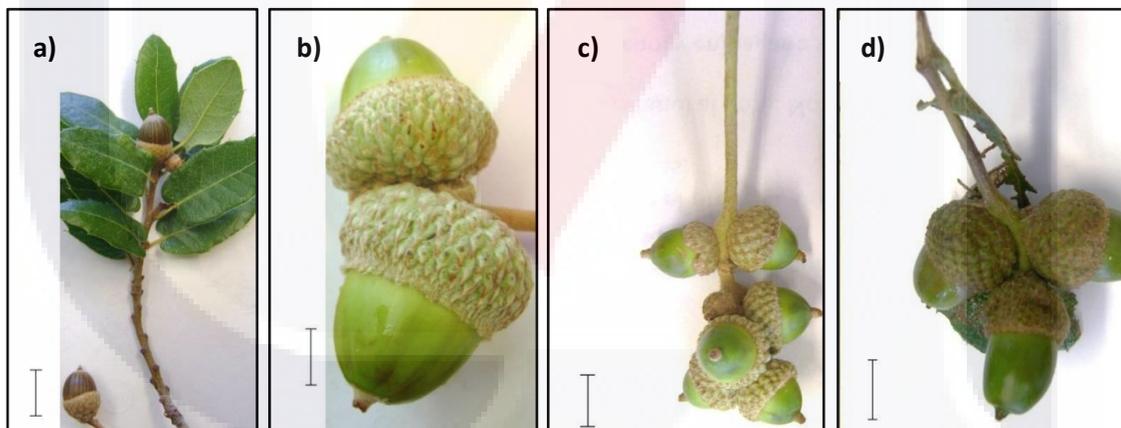


Figura 7. Algunos explantes iniciales (bellotas) de *Quercus* spp.: a) *Q. eduardii*; b) *Q. resinosa*; c) *Q. rugosa*; d) *Q. rugosa*. La barra en la esquina inferior izquierda de la imagen indica la longitud de 1 cm.

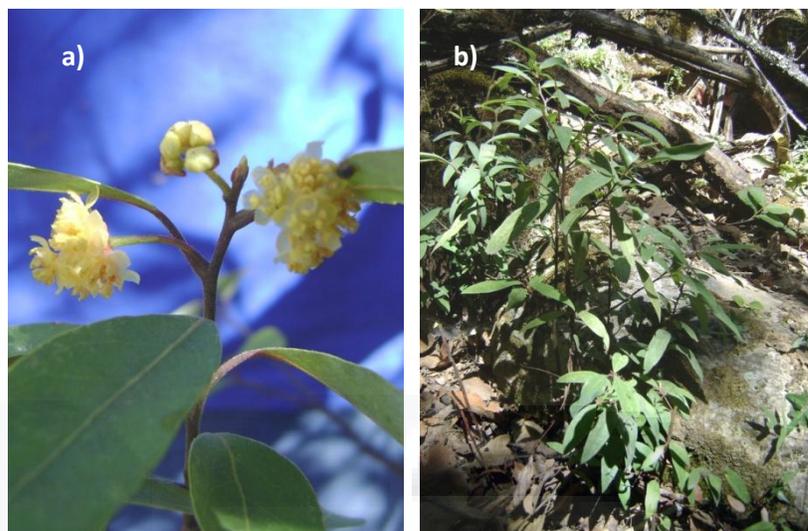


Figura 8. a) Floración de laurel silvestre. b) Planta de laurel silvestre (*L. glaucescens*) en campo.

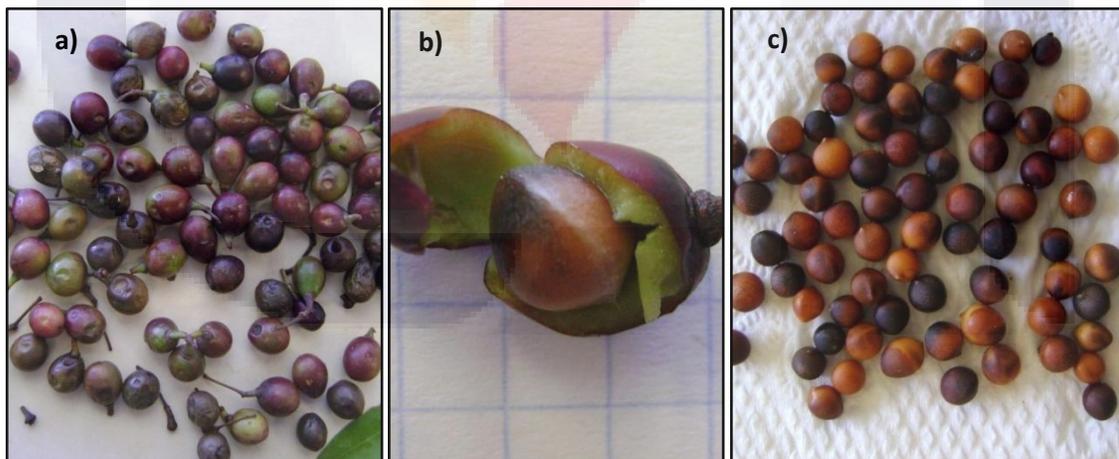


Figura 9. Obtención de los explantes iniciales de *L. glaucescens*: a) Frutos maduros de laurel silvestre; b) separación manual de la semilla del fruto de laurel silvestre. Cada cuadro mide 70 mm de lado; c) explantes iniciales (semillas) después de lavado con agua corriente y jabón.

6.2. DESINFECCIÓN DE LOS EXPLANTES DE *Quercus* spp.

Cuadro 5. Porcentaje de desinfección de bellotas de *Quercus* spp.

Especie	n	Porcentaje de contaminación	Porcentaje de desinfección
<i>Q. eduardii</i>	755	11.2 %	88.8 %
<i>Q. resinosa</i>	768	13.0 %	87.0 %
<i>Q. rugosa</i>	525	12.9 %	87.1 %
<i>Q. laeta</i>	273	44.5 %	55.5 %
<i>Q. grisea</i>	88	0.0 %	100.0 %
<i>Q. castanea</i>	64	0.0 %	100.0 %
<i>Q. potosina</i>	196	46.7 %	53.3 %

Los resultados se tomaron de 7 a 9 días después de la inoculación inmediata al protocolo de desinfección.

En los casos en que se tienen altos porcentajes de contaminación, para el de *Q. resinosa* fue debido a que las bellotas que pudieron colectarse en la primera temporada presentaban daños por picaduras de insectos y no se logró una desinfección efectiva por lo que posteriormente se presentaban levaduras. Para el caso de *Q. laeta*, la contaminación que se presentó fue por hongos.

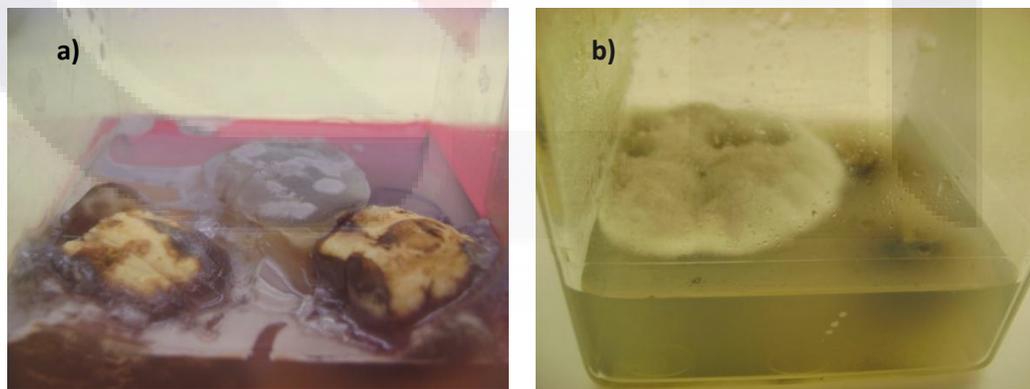


Figura 10. a) Contaminación de bellotas de *Q. resinosa*; notése el daño en las bellotas por picaduras de insectos, así como la oxidación por producción de compuestos fenólicos. b) Contaminación y oxidación de bellotas de *Q. laeta*.

6.3. DESINFECCIÓN DE EXPLANTES DE *L. glaucescens*

Se realizaron varios tratamientos, de los cuales se eligió el tratamiento 9 como protocolo de desinfección por presentar un índice de contaminación menor aunado a la presencia de germinación en los explantes tratados.

Cuadro 6. Porcentaje de desinfección para las semillas de *L. glaucescens* bajo diferentes tratamientos

TRATAMIENTO [TD;C;TC]*	PRIMERA INOCULACIÓN			SEGUNDA INOCULACIÓN		
	n	Contaminación (%)	Desinfección (%)	MEDIO	n	Contaminación (%)
1 [5 min (x 3); 25%; 25 min]	56	57.1	42.9	A	13	0.0
				B	11	0.0
2 [10 min (x 3); 25%; 25 min]	32	12.5	87.5	A	14	100.0
				B	14	100.0
3 [10 min (x 3); 50%; 25 min]	262	100.0	0.0	A	----	----
				B	----	----
4 [10 min (x 3); 100%; 25 min]	30	50.0	50.0	A	5	0.0
				B	5	0.0
5 [10 min (x 3); 80%; 40 min]	10	90.0	10.0	A	----	----
				B	1	0.0
6 [10 min (x 3); 100%; 15 min]	10	90.0	10.0	A	----	----
				B	1	0.0
7 [15 min (x 3); 100%; 15 min]	12	58.3	41.7	A	3	66.7
				B	2	100.0
8 [15 min (x 3); 50%; 50 min]	10	60.0	40.0	A	2	50.0
				B	2	50.0
9 [15 min (x 3); 60%; 60 min]	171	42.5	57.5	A	73	24.0
				B	27	27.1

---- indica que no hay resultados porque no hubo explantes desinfectados en la primera inoculación. Los resultados se tomaron de 7 a 9 días después de las inoculaciones.

* TD: Tiempo del lavado con detergente Dermoclean al 10%; C: concentración del blanqueador comercial Cloralex®; TC: Tiempo de exposición al blanqueador comercial. En todos los tratamientos excepto el 1 se usó una solución fungicida por 24 horas previo a los lavados.

La contaminación en todos los casos fue endófito y se puede suponer que es un hongo debido a las estructuras miceliales que forma sobre la superficie de las semillas.

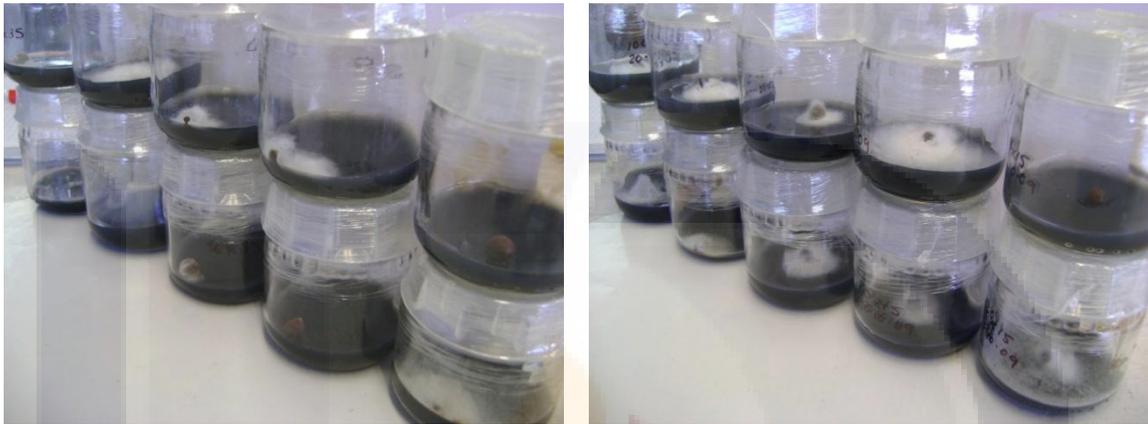


Figura 11. Contaminación de las semillas de *L. glaucescens*. En la imagen izquierda, para el tratamiento 5; a la derecha, para el tratamiento 6.

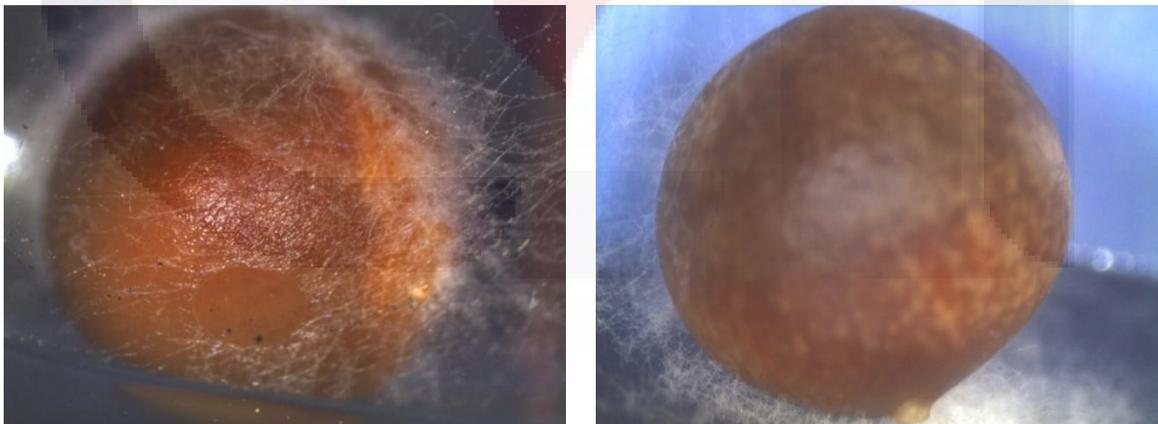


Figura 12. Contaminación de las semillas de *L. glaucescens*. Nótese la estructura micelial sobre la semillas; en la imagen de la derecha, puede apreciarse el inicio de la germinación de la semilla

Una vez elegido el tratamiento de desinfección 9, se comenzó dicha desinfección para un número mayor de semillas, para así poder obtener plántulas en condiciones axénicas. Para esta etapa las inoculaciones se hicieron en medio A únicamente, ya que para medio B no se tuvo respuesta de formación de embriones somáticos en ningún caso. Los resultados de la desinfección se muestran a continuación.

Cuadro 7. Porcentaje de desinfección de semillas de *L. glaucescens* con el tratamiento 9

	n	Contaminación (%)	Desinfección* (%)
Primera inoculación	607	28.5	71.5
Segunda inoculación	178	12.9	87.1

* Los resultados se tomaron de 10 a 15 días después de la primera inoculación en medio MS + 4 mg L⁻¹ de carbón activado para asegurar la confiabilidad de los resultados.

6.4. GERMINACIÓN Y NÚMERO DE BROTES POR EXPLANTE DE *Quercus* spp.

Después de aproximadamente dos meses de la inoculación de las bellotas desinfectadas en medio MS adicionado con 4 mg L⁻¹ de BA se realizó el conteo del número de brotes generados por explante, los resultados se muestran a continuación. Cabe resaltar que la especie con mejor resultado fue *Q. eduardii*.

Cuadro 8. Porcentaje de germinación y número promedio de brotes por explante para las especies de *Quercus* spp.

Especie	Germinación (%)	Brotes / Explante ^[*] (Media ± Error)
<i>Q. eduardii</i>	46.5	2.7 ± 0.52
<i>Q. resinosa</i>	29.6	0.7 ± 0.22
<i>Q. rugosa</i>	36.1	1.8 ± 0.41
<i>Q. laeta</i>	00.7	0.0 ± 0.00
<i>Q. grisea</i>	55.6	0.6 ± 0.14
<i>Q. castanea</i>	87.5	0.5 ± 0.24
<i>Q. potosina</i>	08.5	0.1 ± 0.08

^[*] Calculado en base al número de explantes que germinaron

Los resultados del porcentaje de germinación se tomaron a los 22 días después de la inoculación en medio de cultivo MS adicionado con 4 mg L⁻¹ de BA, mientras que el número de brotes por explante se tomó de 45 a 60 días después de la inoculación.



Figura 13. Brotación múltiple de bellota de *Q. eduardii* en medio MS adicionado con 4 mg L^{-1} de BA. Nótese el fenómeno de dominancia apical en el brote central.



Figura 14. Germinación de bellota de *Q. rugosa* en medio MS adicionado con 4 mg L^{-1} de BA. Derecha: algunos explantes con brotación múltiple.

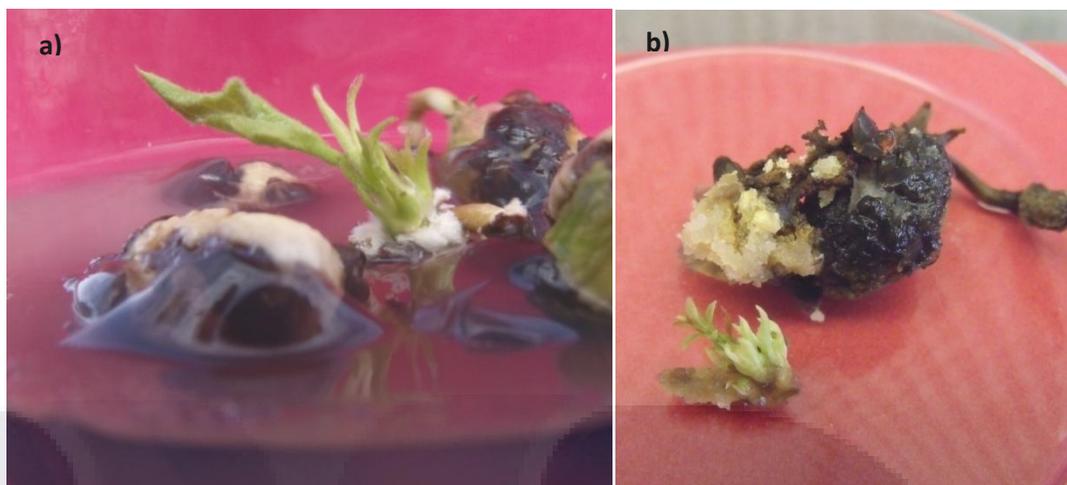


Figura 15. Germinación de bellotas de *Q. grisea* en medio MS adicionado con 4 mg L⁻¹ de BA. a) Brotación inicial. Nótese la oxidación severa de los explantes y del medio debida a la excreción de compuestos fenólicos. b) Formación de tejido calloso y brotes. Nótese la oxidación severa del explante.

Los explantes de *Q. laeta* fueron los más afectados por la oxidación tan severa del medio, lo cual no permitió el desarrollo de los brotes en los pocos casos en que se presentó emergencia radicular; además, hubo formación de tejido calloso.



Figura 16. Bellotas de *Q. laeta* en medio MS adicionado con 4 mg L⁻¹ de BA. Nótese la oxidación de los explantes, la formación de tejido calloso y la ausencia de brotes.

En cuanto a *Q. resinosa* se pudieron coleccionar muy pocas bellotas en la temporada 2009 y la totalidad de éstas presentaban daños por heridas de insectos por lo que hubo gran excreción de compuestos fenólicos y contaminación.



Figura 17. Oxidación y contaminación de explantes de *Q. resinosa*.

Sin embargo, durante la temporada 2010, las bellotas de esta especie mostraron mejores resultados tanto en la desinfección como en la germinación.



Figura 18. Brotación múltiple de explantes de *Q. resinosa* en medio MS adicionado con 4 mg L⁻¹ de BA.

Con respecto a la especie *Q. castanea*, la última que pudo ser colectada en la temporada de 2009 y no había sido probada en proyectos anteriores, la respuesta general no fue la brotación múltiple sino la formación de embriones somáticos con características asincrónicas. Aún cuando hubo algunos brotes, éstos no fueron funcionales ya que no desarrollaron hojas.



Figura 19. Germinación de bellotas de *Q. castanea* en medio MS adicionado con 4 mg L⁻¹ de BA. Nótese la formación de embriones somáticos.

Cuadro 9. Embriogénesis somática en *Q. castanea*

n	Embriogénesis Somática	Embriones en estado globular (Media ± Error)	Embriones en estado corazón (Media ± Error)	Embriones en estado torpedo (Media ± Error)	Embriones maduros (Media ± Error)
64	57.8 %	1.25 ± 0.194	5.38 ± 0.455	0.38 ± 0.125	2.63 ± 0.272

Los resultados se tomaron de 65 a 70 días después de la inoculación en medio MS adicionado con 4 mg L⁻¹ de BA.

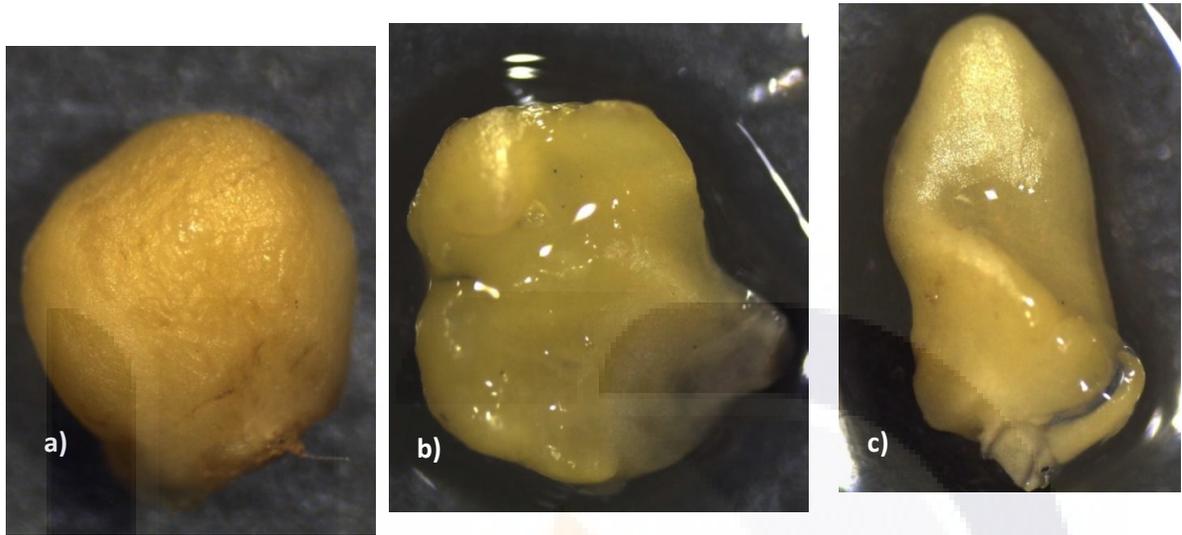


Figura 20. Embriones somáticos de *Q. castanea* en diferentes estadios: a) globular, b) corazón, y c) torpedo.

6.5. GERMINACIÓN DE EXPLANTES INICIALES DE *L. glaucescens*

Los resultados obtenidos después de los tratamientos de desinfección 1 al 8 no fueron satisfactorios ya que no hubo germinación en ningún caso.

Cuadro 10. Porcentaje de germinación bajo los diferentes tratamientos de desinfección para laurel

Tratamiento	[TD; C; TC] [*]	Germinación (%)
1	[5 min (x 3); 25%; 25 min]	0.0
2	[10 min (x 3); 25%; 25 min]	0.0
3	[10 min (x 3); 50%; 25 min]	0.0
4	[10 min (x 3); 100%; 25 min]	0.0
5	[10 min (x 3); 80%; 40 min]	0.0
6	[10 min (x 3); 100%; 15 min]	0.0
7	[15 min (x 3); 100%; 15 min]	0.0
8	[15 min (x 3); 50%; 50 min]	0.0
9	[15 min (x 3); 60%; 60 min]	23.8

Los resultados del porcentaje de germinación se tomaron a los 22 días después de la inoculación en medio de cultivo MS adicionado con 4 g L⁻¹ de carbón activado (medio A).

^{*} TD: Tiempo del lavado con detergente Dermoclean al 10%; C: concentración del blanqueador comercial Cloralex®; TC: Tiempo de exposición al blanqueador comercial. En todos los tratamientos excepto el 1 se usó una solución fungicida por 24 horas previo a los lavados.

Una vez elegido el tratamiento 9 en medio A como método de desinfección para las semillas de laurel, se comenzó la desinfección en forma intensiva, lográndose los siguientes resultados:

Cuadro 11. Porcentaje de germinación con el tratamiento de desinfección 9 para las semillas de *L. glaucescens*

	n	Germinación (%)
Segunda inoculación	178	20.7

Los resultados del porcentaje de germinación se tomaron a los 22 días después de la inoculación en medio de cultivo MS adicionado con 4 g L⁻¹ de carbón activado (medio A).



Figura 21. Proceso de germinación *in vitro* y obtención de brotes de laurel *L. glaucescens* en condiciones axénicas en medio MS adicionado con 4 g L⁻¹ de CA. a) Germinación de semilla; b) Corte del brote apical y estimulación del crecimiento de brotes; c) Obtención de brotes por inducción de yemas axilares; d) Obtención de brotes. Note el crecimiento del brote a partir de las yemas axilares.

6.6. BROTACIÓN POR INDUCCIÓN DE YEMAS AXILARES DE *L. glaucescens*

Este experimento fue el resultado de la búsqueda por obtener la mayor cantidad de brotes a partir del poco material con que se contaba de la especie *L. glaucescens*. Se utilizó como medio de cultivo el MS, pH 5.7 adicionado con 0.5 mg L⁻¹ de BA y 8 g L⁻¹ de agar, y como explantes secciones internodales de tamaño promedio de 3 cm.

Cuadro 12. Brotación por inducción de yemas axilares de *L. glaucescens*

Posición del explante	n	Brotos/explante	Tamaño del brote (cm)
Vertical	10	0.00 ± 0.00	----
Horizontal	10	2.10 ± 0.33	2.93 ± 0.55

Los resultados se tomaron 45 días después de la inoculación en el medio MS adicionado con 0.5 mg L⁻¹ de BA.

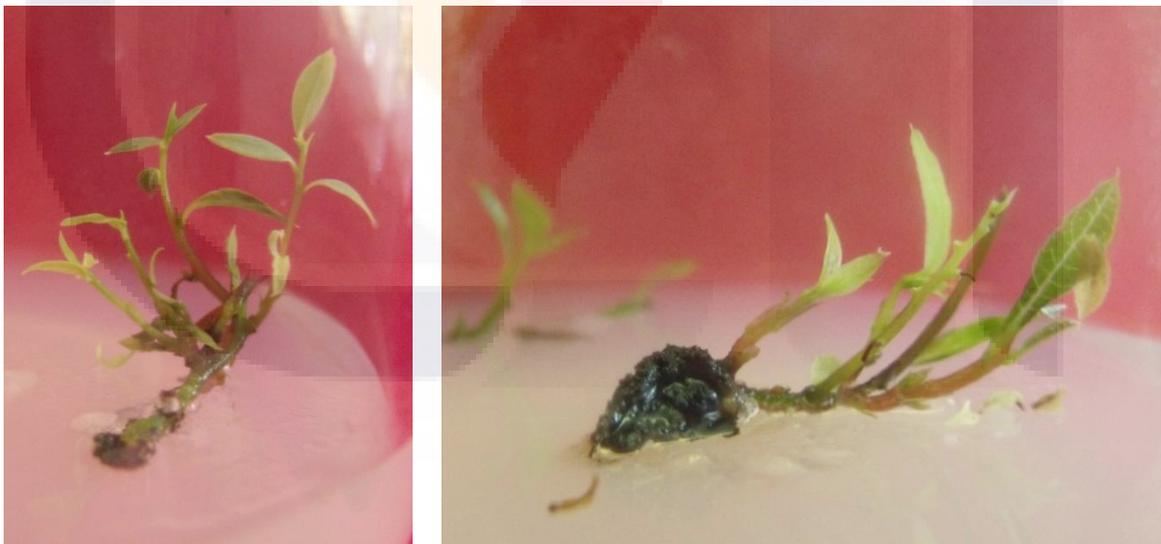


Figura 22. Brotación por inducción de yemas axilares de *L. glaucescens* en medio MS adicionado con 0.5 mg L⁻¹ de BA

Aun cuando la brotación obtenida con los explantes en posición horizontal podría considerarse buena, estos explantes no produjeron respuestas favorables al enraizamiento, por lo que no se utilizó este tipo de obtención de brotes para etapas posteriores del proyecto.

6.7. ELONGACIÓN Y ENRAIZAMIENTO DE LOS BROTES DE *Quercus* spp.

Durante esta etapa se pudo observar que las respuestas al enraizamiento son variadas entre especies y en algunos casos no pudieron llevarse a cabo. La especie que mostró mejor respuesta al enraizamiento fue *Q. eduardii* como se puede observar en la Figura 23.

Cuadro 13. Enraizamiento de brotes de *Quercus* spp. generados *in vitro*

Especie	n	Enraizamiento (%)	Raíces/Explante (Media ± Error)	Longitud de la raíz en cm (Media ± Error)
<i>Q. eduardii</i>	260	69.6	4.6 ± 0.34	4.1 ± 0.21
<i>Q. rugosa</i>	176	2.9	0.6 ± 0.40	0.8 ± 0.54
<i>Q. grisea</i>	10	0.0	0.0 ± 0.00	----
<i>Q. resinosa</i>	232	44.5	5.0 ± 0.79	1.4 ± 0.29

Los resultados se tomaron a los 30 días después de la inoculación en medio MS₂ sin regulador de crecimiento vegetal.

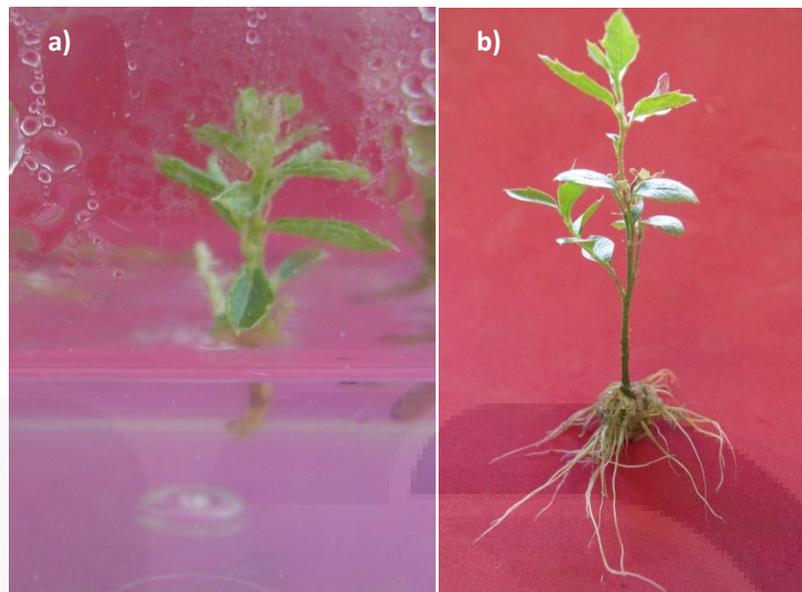


Figura 23. a) Brote de *Q. eduardii* en medio de cultivo MS_½ adicionado con 10 mg L⁻¹ de IBA para inducir el enraizamiento. Nótese la ausencia de raíces. b) Plántula de *Q. eduardii* después de 22 días de la inducción del enraizamiento.

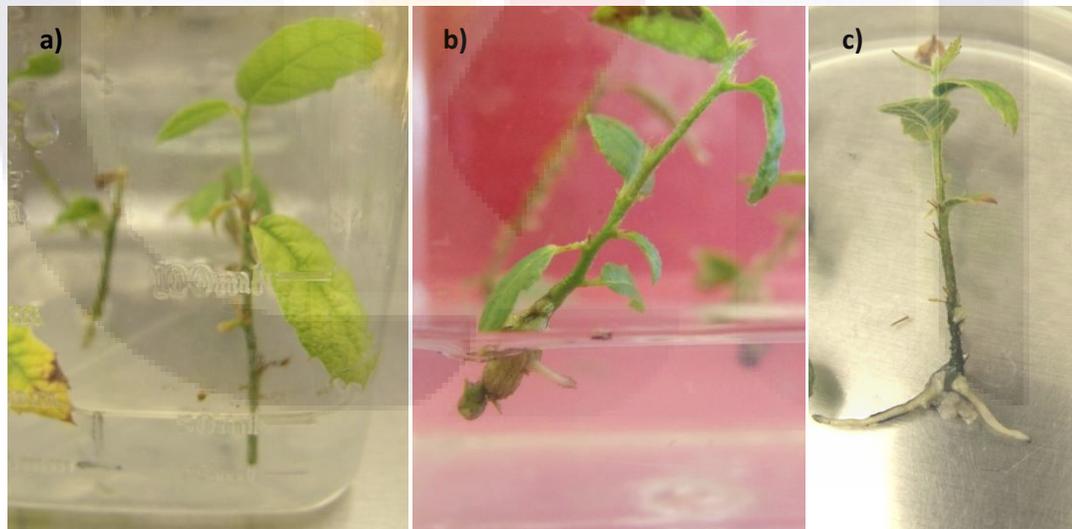


Figura 24. a) Brotes de *Q. rugosa* en medio de cultivo MS_½ adicionado con 10 mg L⁻¹ de IBA para inducir el enraizamiento. Nótese la ausencia de raíces. b) Brote de *Q. rugosa* con inicio de formación de raíces. c) Plántula de *Q. rugosa* después de 30 días de la inducción de enraizamiento.



Figura 25. Brote de *Q. grisea* después de 30 días de inoculado en medio $MS_{\frac{1}{2}}$. Nótese la formación de tejido calloso en la base del explante, así como la necrosis en general del brote.

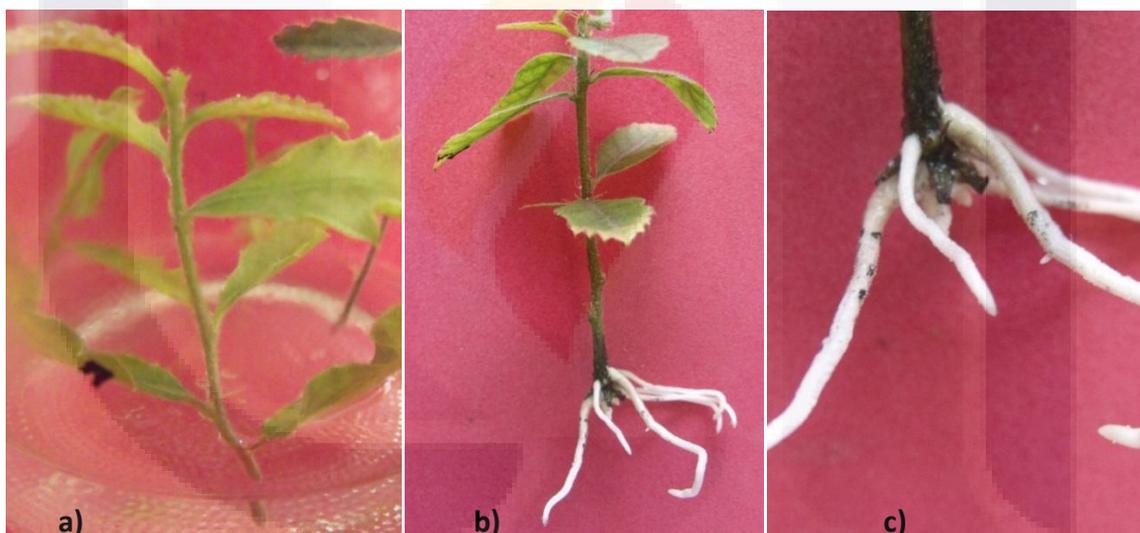


Figura 26. a) Brotes de *Q. resinosa* en medio de cultivo $MS_{\frac{1}{2}}$ adicionado con 10 mg L^{-1} de IBA para inducir el enraizamiento; b) Plántula de *Q. resinosa* obtenida *in vitro*; c) Raíces de la plántula, nótese el inicio de la formación de raíces secundarias.

6.8. ELONGACIÓN Y ENRAIZAMIENTO DE BROTES DE *L. glaucescens*

Cuadro 14. Enraizamiento de brotes de *L. glaucescens* generados *in vitro* bajo diferentes tratamientos

Tratamiento	[RCV/T] [*]	n	Enraizamiento (%)	Raíces/Explante (Media ± Error)	Longitud de la raíz en cm (Media ± Error)
1	[0.5 ANA/ 15 días]	16	0.0%	----	----
	[0.5 IBA/7 días]	5	0.0%	----	----
2	[1.0 IBA/7 días]	5	0.0%	----	----
	[1.5 IBA/7 días]	5	20.0%	0.6 ± 0.60	0.5 ± 0.48
3	[1.5 IBA/15 días]	5	0.0%	----	----
	[2.0 IBA/15 días]	5	0.0%	----	----
	[2.5 IBA/15 días]	5	40.0%	1.00 ± 0.78	0.3 ± 0.19
4	[0.5 IBA/30 días]	10	20.0%	0.8 ± 0.61	0.2 ± 0.16
	[1.0 IBA/30 días]	10	60.0%	1.8 ± 0.74	1.3 ± 0.44
	[1.5 IBA/30 días]	10	0.0%	----	----
5	[1.5 IBA/30 días]	5	0.0%	----	----
	[2.0 IBA/30 días]	5	0.0%	----	----
	[2.5 IBA/30 días]	5	40.0%	2.5 ± 1.50	0.7 ± 0.23
6	[5.0 IBA/7 días]	5	40.0%	1.0 ± 0.00	0.5 ± 0.00
	[10.0 IBA/7 días]	5	0.0%	----	----
	[20.0 IBA/7 días]	5	0.0%	----	----

^[*] RCV: Concentración en mg L⁻¹ y tipo de regulador de crecimiento vegetal/ T: tiempo de exposición al RCV. Los resultados de enraizamiento se tomaron a los 30 días después de la inoculación en medio sin RCV.



Figura 27. Brotes de laurel silvestre de plántulas germinadas *in vitro* en el tratamiento de enraizamiento 1 (ANA a concentración 0.5 mg L^{-1} por 15 días).

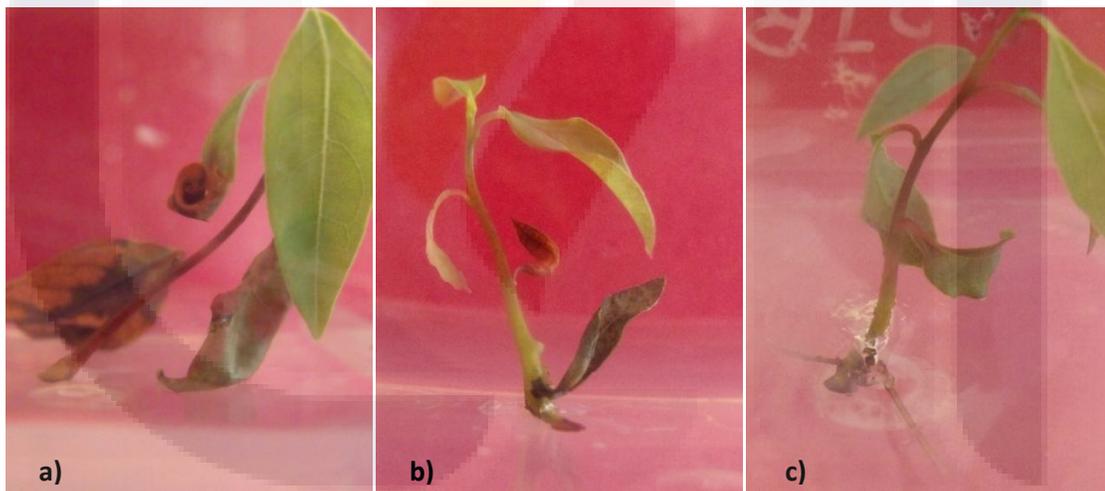


Figura 28. Brotes de *L. glaucescens* sometidos al tratamiento 2 en medio $MS_{1/2}$, 30 días después de la exposición al RCV. a) Brote de laurel sometido a 0.5 mg L^{-1} IBA; b) brote de laurel sometido a 1.0 mg L^{-1} IBA; c) brote de laurel sometido a 1.5 mg L^{-1} IBA.

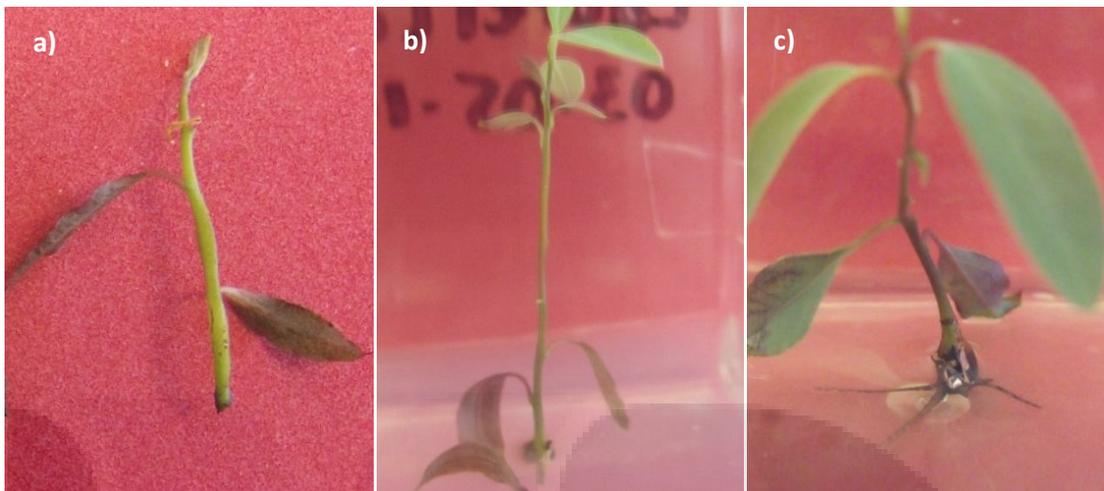


Figura 29. Brotes de *L. glaucescens* en el tratamiento 3 sometidos a: a) 1.5 mg L⁻¹ IBA, b) 2.0 mg L⁻¹ IBA, y c) 2.5 mg L⁻¹ IBA, 30 días después de ser cambiado a medio sin RCV.



Figura 30. Brotes de *L. glaucescens* en el tratamiento 4 sometidos a: a) 0.5 mg L⁻¹ IBA, b) 1.0 mg L⁻¹ IBA y c) 1.5 mg L⁻¹ IBA, 30 días después de ser cambiado a medio sin RCV.

6.9. TRANSFERENCIA A MACETA E INOCULACIÓN MICORRÍCICA

6.9.1. Transferencia a maceta e inoculación micorrícica para *Quercus* spp. en el enfoque 1

Solamente se lograron obtener plántulas para la especie *Q. eduardii*, con las características adecuadas para probar esta etapa del proyecto. Como se mencionó anteriormente en el enfoque 1 la inoculación micorrícica se realiza en el trasplante, esto es, el inóculo se encuentra mezclado con algún sustrato en donde se colocaron las plántulas obtenidas *in vitro*. Las macetas se cubrieron con bolsa plástica y se dejaron en cámara de aclimatación por 7 días, después de los cuales se abre gradualmente la bolsa y se transfieren al invernadero.

Cuadro 15. Supervivencia al trasplante de las plántulas cultivadas *in vitro* de la especie *Q. eduardii* en el enfoque 1

Tratamiento	Sustrato	n	Supervivencia (%)			
			7 días *	14 días *	21 días *	28 días *
1	Turba	21	62.5	33.3	0.0	0.0
2	Turba- IB ^{&}	6	66.7	16.7	0.0	0.0
3	Turba – MC ⁺	21	70.8	33.3	5.0	0.0
4	IB ^{&}	10	60.0	30.0	0.0	0.0

* Se refiere a los días después del trasplante, tiempo en los que se tomaron los resultados.

& IB: inóculo bruto, *i. e.* suelo de bosques de encino

+ MC: micorriza comercial *Glomus intraradices*

Cuadro 16. Crecimiento relativo después del trasplante de las plántulas cultivadas *in vitro* de la especie *Q. eduardii* en el enfoque 1

Tratamiento	Sustrato	Crecimiento relativo [#]		
		7 días [*]	14 días [*]	21 días [*]
1	Turba	1.00	1.00	----
2	Turba- IB ^{&}	1.00	1.00	----
3	Turba – MC ⁺	1.00	1.00	1.00
4	IB ^{&}	1.00	1.00	----

[#] Tomado en base a las plántulas que mostraron supervivencia al trasplante. Para obtener el valor, se dividió el tamaño final de la plántula entre el tamaño inicial. Cualquier valor superior a 1.00 indica que hubo crecimiento después del trasplante.

^{*} Se refiere a los días después del trasplante, tiempo en los que se tomaron los resultados.

[&] IB: inóculo bruto, *i. e.* suelo de bosques de encino

⁺ MC: micorriza comercial *Glomus intraradices*



Figura 31. Transferencia inicial a macetas de plántula cultivada *in vitro* de *Q. eduardii*. A la izquierda, bajo el tratamiento con inóculo bruto; a la derecha, bajo el tratamiento con micorriza comercial *G. intraradices*. Nótese la diferencia en la coloración de las hojas, siete días después de la transferencia.

6.9.2. Transferencia a maceta e inoculación micorrícica para *L. glaucescens* en el enfoque 1

Se lograron obtener pocas plántulas para laurel silvestre, con las características adecuadas para probar esta etapa del proyecto.

Cuadro 17. Supervivencia al trasplante de las plántulas cultivadas *in vitro* de la especie *L. glaucescens* en el enfoque 1

Tratamiento	Sustrato	n	Supervivencia (%)			
			7 días*	14 días*	21 días*	28 días*
1	Turba	5	80.0	40.0	0.0	0.0
2	Turba – MC ⁺	5	80.0	60.0	20.0	0.0

*Se refiere a los días después del trasplante, tiempo en los que se tomaron los resultados.

⁺ MC: micorriza comercial *Glomus intraradices*

Cuadro 18. Crecimiento relativo después del trasplante de las plántulas cultivadas *in vitro* de la especie *L. glaucescens* en el enfoque 1

Tratamiento	Sustrato	Crecimiento relativo [#] (%)		
		7 días*	14 días*	21 días*
1	Turba	1.00	1.00	----
2	Turba – MC ⁺	1.00	1.00	1.00

[#] Tomado en base a las plántulas que mostraron supervivencia al trasplante. Para obtener el valor, se dividió el tamaño final de la plántula entre el tamaño inicial. Cualquier valor superior a 1.00 indica que hubo crecimiento después del trasplante.

*Se refiere a los días después del trasplante, tiempo en los que se tomaron los resultados.

⁺ MC: micorriza comercial *Glomus intraradices*

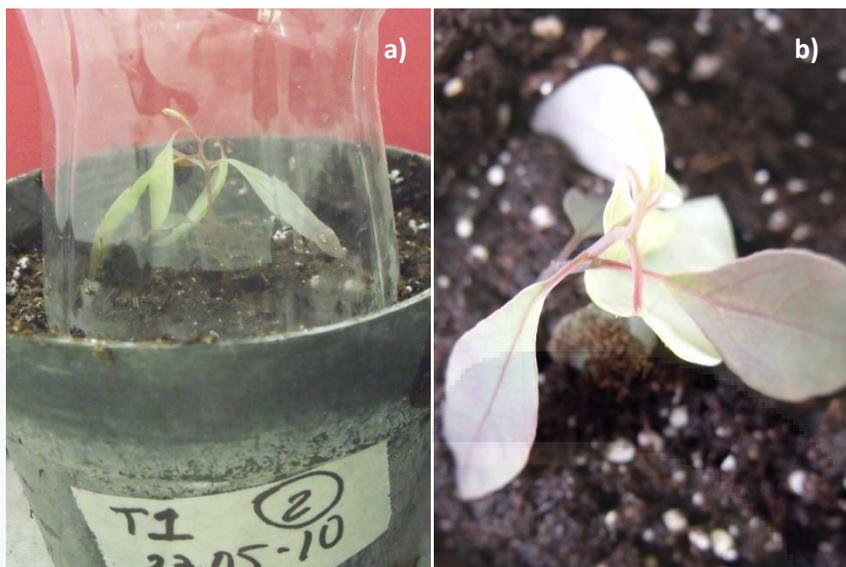


Figura 32.Trasferencia a maceta de *L. glaucescens* en el enfoque 1 con el tratamiento 1: a) durante el trasplante a maceta; b) a los 14 días después del trasplante.



Figura 33. Trasferencia a maceta de *L. glaucescens* en el enfoque 1 con el tratamiento 2: a) durante el trasplante a maceta; b) a los 14 días después del trasplante.

6.9.3. Transferencia a maceta e inoculación micorrícica para *Quercus* spp. en el enfoque 2

Fueron tomadas varias muestras de suelo con raíces de bosques de encino a las cuales se les determinó si existía infección micorrícica; las muestras que arrojaron resultados positivos fueron las que se utilizaron para someterlas al aislamiento de esporas que fue utilizado como inóculo micorrícico para las plántulas obtenidas *in vitro*.

Los resultados del conteo de esporas para las muestras de suelo de laurel, suelo de encino y de la micorriza comercial *G. intraradices* se muestran a continuación. Debido a que las dos primeras son muestras colectadas en campo, se presentaron diferentes tipos de esporas que se agruparon en dos tipos: esporas grandes y esporas pequeñas. Cabe mencionar que esta clasificación es subjetiva.

Cuadro 19. Conteo de esporas en muestras de suelo de bosque de encino y en la muestra de micorriza comercial

Muestra	Esporas / gramo de suelo
Suelo de laurel	70 grandes y 46 pequeñas
Suelo de encino	32 grandes y 21 pequeñas
Micorriza comercial <i>G. intraradices</i>	64

La clasificación “grande” y “pequeña” es subjetiva. Se realizó sólo para diferenciar la composición del aislado a grosso modo.



Figura 34. Observación microscópica (10x) de los aislados de esporas. a) Esporas en el aislado de suelo de laurel; b) Esporas en el aislado de suelo de laurel. Nótese la presencia de diversos tipos de esporas; c) Espora en el aislado de suelo de encino; d) Esporas de micorriza comercial *G. intraradices*.

Las plántulas obtenidas *in vitro*, libres de restos de medio se pusieron en contacto con los aislados de esporas y con el control por un tiempo de entre 3 a 5 días, después de los cuales se hizo el trasplante a macetas con turba.

Cuadro 20. Supervivencia al trasplante y crecimiento relativo de las plántulas cultivadas *in vitro* de la especie *Q. eduardii* en el enfoque 2

Tratamiento ^{&}	n	Supervivencia (%)				Crecimiento relativo [#]			
		7 días*	14 días*	21 días*	28 días*	7 días*	14 días*	21 días*	28 días*
1	10	100.0	0.0	0.0	0.0	1.00	----	----	----
2	15	100.0	66.7	0.0	0.0	1.00	1.00	----	----
3	15	100.0	66.7	33.3	33.3	1.00	1.00	1.25	1.50
4	10	100.0	50.0	0.0	0.0	1.00	1.00	----	----

* Se refiere a los días después del trasplante, tiempo en los que se tomaron los resultados.

[#] Tomado en base a las plántulas que mostraron supervivencia al trasplante. Para obtener el valor, se dividió el tamaño final de la plántula entre el tamaño inicial. Cualquier valor superior a 1.00 indica que hubo crecimiento después del trasplante.

---- Indica que no hubo plantas a las cuales determinar crecimiento.

[&] Tratamientos. 1: control (agua destilada); 2: Esporas suelo de laurel; 3: Esporas suelo de encinos; 4: Esporas de micorriza comercial *G. intraradices*.



Figura 35. Una plántula cultivada *in vitro* de la especie *Q. eduardii* bajo el tratamiento 3: a) después de 21 días del trasplante a maceta; b) después de 28 días del trasplante a maceta, nótese la formación de hojas nuevas en la parte apical.

Cuadro 21. Supervivencia al trasplante y crecimiento relativo de las plántulas cultivadas *in vitro* de la especie *Q. resinosa* en el enfoque 2

Tratamiento ^{&}	n	Supervivencia (%)				Crecimiento relativo [#]			
		7 días*	14 días*	21 días*	28 días*	7 días*	14 días*	21 días*	28 días*
1	18	51.7	36.7	31.7	16.7	1.00	1.02	1.02	1.02
2	15	82.5	62.5	45.0	21.7	1.00	1.00	1.00	1.00
3	16	76.7	65.3	58.7	20.0	1.00	1.01	1.02	1.02
4	15	75.0	43.7	43.7	29.2	1.00	1.00	1.00	1.01

[#] Tomado en base a las plántulas que mostraron supervivencia al trasplante. Para obtener el valor, se dividió el tamaño final de la plántula entre el tamaño inicial. Cualquier valor superior a 1.00 indica que hubo crecimiento después del trasplante.

* Se refiere a los días después del trasplante, tiempo en los que se tomaron los resultados.

[&] Tratamientos. 1: control (agua destilada); 2: Esporas suelo de laurel; 3: Esporas suelo de encinos; 4: Esporas de micorriza comercial *G. intraradices*.



Figura 36. Plántulas cultivadas *in vitro* de la especie *Q. resinosa* después de 21 días del trasplante a maceta: a) bajo el tratamiento 1; b) bajo el tratamiento 2; c) bajo el tratamiento 3; d) bajo el tratamiento 4.

Para la especie *Q. rugosa* sólo se aplicó el tratamiento 3 debido al reducido número de plántulas que se obtuvieron.

Cuadro 22. Supervivencia al trasplante y crecimiento relativo de las plántulas cultivadas *in vitro* de la especie *Q. rugosa* en el enfoque 2

Tratamiento ^{&}	n	Supervivencia (%)				Crecimiento relativo [#]			
		7 días*	14 días*	21 días*	28 días*	7 días*	14 días*	21 días*	28 días*
3	8	87.5	50.0	12.5	0.0	1.00	1.00	1.00	----

[#] Tomado en base a las plántulas que mostraron supervivencia al trasplante. Para obtener el valor, se dividió el tamaño final de la plántula entre el tamaño inicial. Cualquier valor superior a 1.00 indica que hubo crecimiento después del trasplante.

*Se refiere a los días después del trasplante, tiempo en los que se tomaron los resultados.

---- Indica que no hubo plantas a las cuales determinar crecimiento.

[&] Tratamiento 3: Inoculación con aislado de suelo de encino.



Figura 37. Plántula cultivada *in vitro* de la especie *Q. rugosa* después de 21 días del trasplante a maceta bajo el tratamiento 3.

6.9.4. Transferencia a maceta e inoculación micorrícica para *L. glaucescens* en el enfoque 2

Los inóculos micorrícicos utilizados para laurel silvestre son los mismos que se utilizaron para *Quercus* spp., sin embargo, no se contaba con plántulas suficientes para montar experimentos para cada uno de los cuatro tratamientos por lo que se seleccionaron sólo tres tratamientos.

Cuadro 23. Supervivencia al trasplante y crecimiento relativo de las plántulas cultivadas *in vitro* de la especie *L. glaucescens* en el enfoque 2

Tratamiento ^{&}	n	Supervivencia (%)				Crecimiento relativo [#]			
		7 días [*]	14 días [*]	21 días [*]	28 días [*]	7 días [*]	14 días [*]	21 días [*]	28 días [*]
1	12	100.0	50.0	50.0	30.0	1.00	1.00	1.21	1.26
2	12	100.0	75.0	50.0	40.0	1.00	1.00	1.06	1.16
3	6	100.0	100.0	66.7	33.3	1.00	1.00	1.00	1.00

[#] Tomado en base a las plántulas que mostraron supervivencia al trasplante. Para obtener el valor, se dividió el tamaño final de la plántula entre el tamaño inicial. Cualquier valor superior a 1.00 indica que hubo crecimiento después del trasplante.

^{*} Se refiere a los días después del trasplante, tiempo en los que se tomaron los resultados.

[&] Tratamientos. 1: control (agua destilada); 2: esporas de suelo de laurel; 3: esporas de micorriza comercial *G. intraradices*.

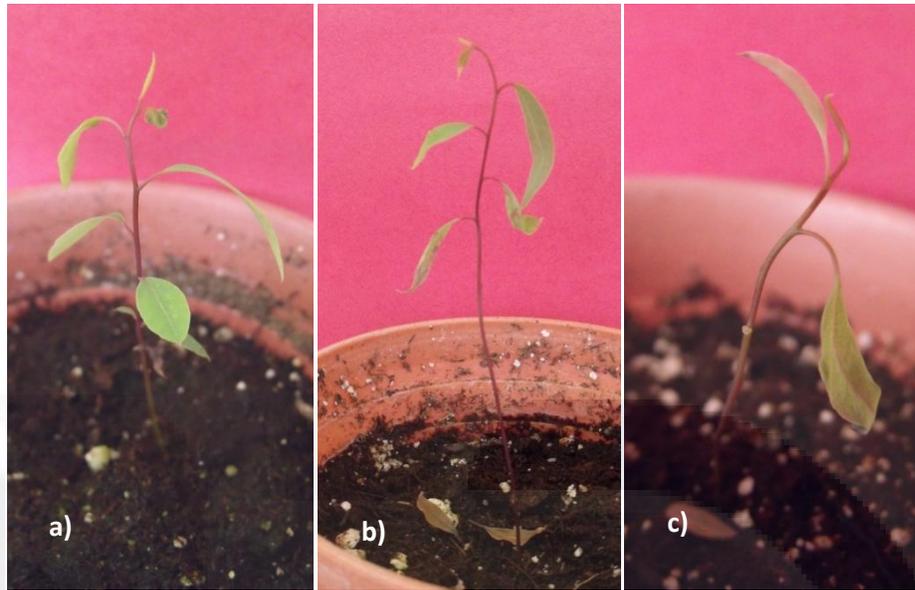


Figura 38. Plántulas cultivadas *in vitro* de la especie *L. glaucescens* después de 21 días del trasplante a maceta: a) bajo el tratamiento 1; b) bajo el tratamiento 2; c) bajo el tratamiento 3.

6.10. GERMINACIÓN DE SEMILLAS EN EL INVERNADERO

Se muestran a continuación los resultados de las semillas germinadas *in vivo* en el invernadero para algunas de las especies que se trabajaron también por cultivo *in vitro*.

Cuadro 24. Germinación *in vivo* de las semillas de *Quercus* spp. y *L. glaucescens*

Especie	Tratamiento*	n	Germinación (%)
<i>Q. resinosa</i>	1	39	7.8
	2	39	28.9
<i>Q. eduardii</i>	1	64	37.5
	2	64	39.1
<i>Q. potosina</i>	1	68	6.3
	2	68	47.5
<i>L. glaucescens</i>	1	111	23.4
	2	111	8.1

*Tratamientos. 1: sustrato turba; 2: sustrato turba con micorriza comercial *G. intraradices*. Los resultados se tomaron a los 22 días después de haber sembrado las semillas en los sustratos.



Figura 39. *Q. resinosa* en invernadero después de 5 meses de la siembra de semillas. a) Bellota en sustrato turba. Nótese las picaduras de insectos, la presencia de hongos saprófitos y ausencia de germinación; b) Plantas bajo tratamiento 1 (turba); c) Plantas bajo el tratamiento 2 (turba con micorriza comercial *G. intraradices*).



Figura 40. *Q. eduardii* en invernadero después de 5 meses de la siembra de semillas. a) Plantas bajo el tratamiento 1 (turba). b) Plantas bajo el tratamiento 2 (turba con micorriza comercial *G. intraradices*).



Figura 41. *Q. potosina* en invernadero después de 5 meses de la siembra de semillas. a) Plantas bajo el tratamiento 1 (turba). b) Plantas bajo el tratamiento 2 (turba con micorriza comercial *G. intraradices*).

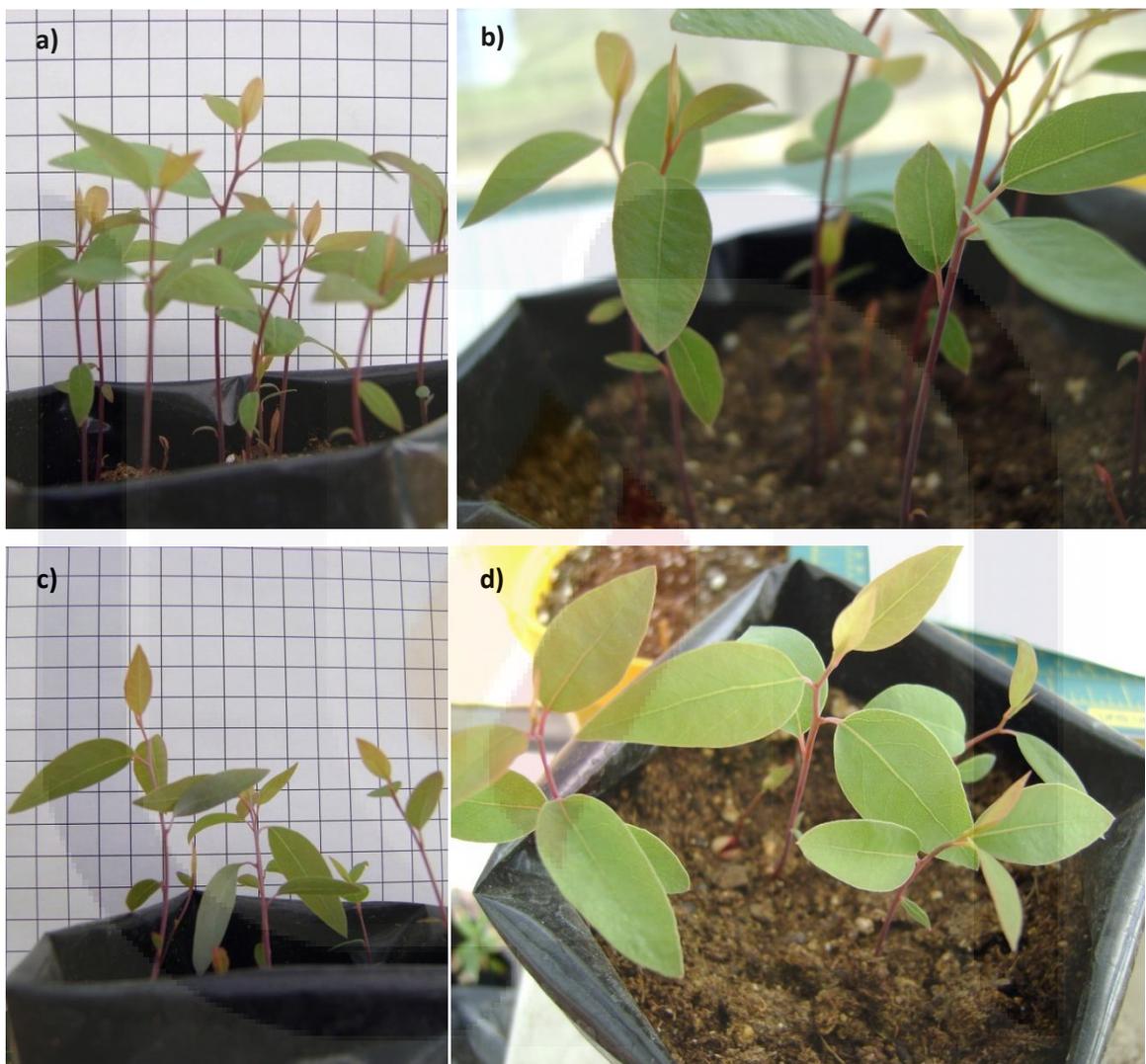


Figura 42. *L. glaucescens* en invernadero después de 2 meses de la siembra de semillas. a) Plantas bajo el tratamiento 1 (turba); b) acercamiento de plantas bajo el tratamiento 1. c) Plantas bajo el tratamiento 2 (turba con micorriza comercial *G. intraradices*); d) acercamiento de plantas bajo el tratamiento 2. *Nota:* Cada cuadro en el fondo mide 1 cm de lado.

6.11. ESTABLECIMIENTO Y DESARROLLO INICIAL EN CAMPO EN LA ESTACIÓN BIOLÓGICA “AGUA ZARCA”

Cuadro 25. Supervivencia al trasplante en campo en la estación biológica

Especie	n	Supervivencia (%)
		14 días*
<i>L. glaucescens</i>	6	33.3%

* Días transcurridos después del establecimiento en suelo.

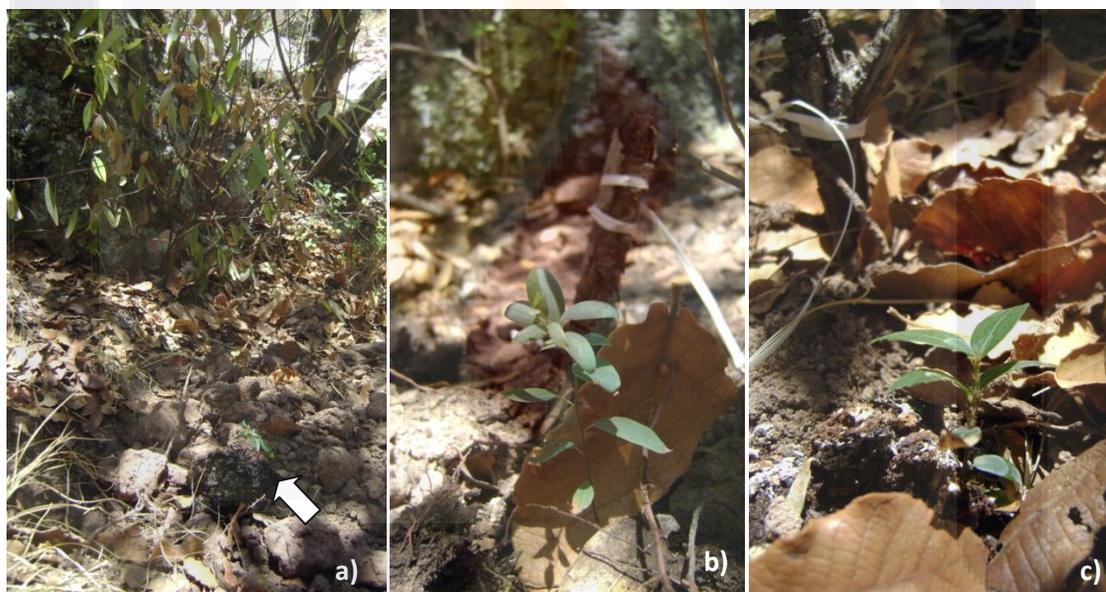
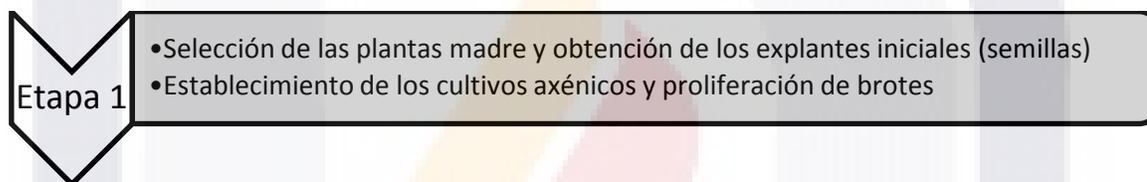


Figura 43. Establecimiento inicial en suelo de especies forestales generadas *in vitro* en la estación biológica “Agua Zarca”: a) *L. glaucescens* generado *in vitro* junto a uno silvestre; b) *L. glaucescens*; c) *Q. eduardii*.

7. DISCUSIÓN

En la sección de metodología se presentó un esquema general tal como se puede ver en la Figura 1) y se hizo la descripción a groso modo de lo que consistió cada una de ellas. A continuación se presenta la discusión de los resultados así como las observaciones para cada una de esas etapas, sin embargo es importante resaltar que estas etapas no están totalmente separadas una de la otra, sino más bien enlazadas, en muchas ocasiones estuvieron realizándose simultáneamente por la disposición del material inicial en diferente tiempo y cada etapa siguiente depende de la anterior sobre todo en lo que respecta al tamaño de la muestra.



La etapa 1 del presente proyecto consistió en dos puntos fundamentales para las siguientes etapas: la selección de las plantas madre y el establecimiento de los cultivos axénicos.

La selección de las plantas madre, resultó crucial para todas las especies con que se trabajó en el presente proyecto, y confirma el consenso general actual de que la fase 0 o preparativa es importante, o casi indispensable en el desarrollo de un esquema de micropropagación real y repetible como señala Pérez (1998). De acuerdo a las observaciones y posteriores resultados obtenidos, esto es el origen del éxito del siguiente punto que es el establecimiento de los cultivos axénicos. Se observó que cuanto más favorable fuera el estado fisiológico de la planta, es decir, si las plantas madre se observaban sanas y en condiciones adecuadas, el establecimiento de los cultivos axénicos se logró con mayor facilidad que en aquellos casos donde se seleccionaron plantas que no cumplieron totalmente con un buen estado fisiológico. Esto es debido a la presencia de contaminantes. Ahora bien, lo ideal sería haber seleccionado únicamente las sanas y en buen estado o que se tuvieran bajo condiciones

controladas por ejemplo, en invernadero, sin embargo para el presente proyecto fue necesario el muestreo en campo ya que como se mencionó anteriormente las especies de interés se encuentran en zonas montañosas a alturas sobre el nivel del mar que oscilan entre los 2000 y 2500 msnm aproximadamente, por lo cual no es posible tenerlas en dichas condiciones. Para *Quercus* spp., un caso particular sobre la importancia de la selección inicial fue muy notorio: *Q. resinosa* durante la temporada 2009 se vio atacada por lo que parecía una plaga de insectos que se alimentaban del pericarpo de las bellotas por lo que los explantes iniciales tenían picaduras que dificultaron la desinfección y por tanto se tuvieron resultados negativos; sin embargo, durante la temporada 2010, esta misma especie se observó sana y produjo gran cantidad de bellotas, que mostraron muy buenos resultados. Con respecto a *L. glaucescens*, debido al poco material que se encuentra actualmente en campo, no hubo la posibilidad de seleccionar la planta madre sino que más bien se usaron los recursos que había por tal motivo, muchos de los explantes iniciales mostraban marcas de insectos y posteriormente, durante la etapa de desinfección representaron algunas dificultades que se comentan más adelante.

El inicio de una micropropagación exitosa, especialmente para especies difíciles y recalcitrantes, depende de la calidad de los explantes y de los reguladores de crecimiento usados en el medio de cultivo como señala Giri *et al.* (2003). De lo anterior, la selección de los explantes iniciales se realizó tomando en cuenta tres factores: primeramente el estado de la planta madre ya que tiene relación directa con la calidad de los explantes; segundo la manera en que naturalmente las especies de interés realizan su propagación, por ello, los explantes fueron en todos los casos semillas, que para el caso de los encinos se les conoce comúnmente como bellotas; y tercero, este tipo de explante es ideal para la conservación del material genético, objetivo muy importante sobre todo para laurel silvestre dado que se encuentra en peligro de extinción.

La obtención de los explantes iniciales requirió de varios recorridos a las zonas montañosas que tienen bosques de encino y por tanto son hábitat de las especies de interés del proyecto. Para el caso de *Quercus* spp. fueron necesarios varios recorridos debido a que existe una producción de bellotas irregular para cada especie y para algunas como es el caso de *Q. laeta* y *Q. grisea* se observó que dicha producción es baja, además, el ciclo reproductivo en todas las especies es largo, generalmente anual y las bellotas pueden ser almacenadas por un período

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

corto, tal como señalan varios autores como Nandi *et al.* (2002) y Ostrolucká *et al.* (2007) . Para el caso de *L. glaucescens*, el ciclo reproductivo también es largo y además de esta especie lo que se colectaron fueron frutos que debieron ser madurados de tres a cuatro semanas para poder extraer de ellos las semillas, que contrariamente a *Quercus* spp. éstas sí pueden ser almacenadas por períodos prolongados de tiempo. Cabe mencionar que la obtención de estos frutos representó dificultades principalmente porque *L. glaucescens* se encuentra en barrancas normalmente poco accesibles y aunado a lo anterior, existen muy pocos especímenes en estado arbóreo como se puede observar en la Figura 8, lo cual muy probablemente sea debido al saqueo que sufre esta especie. Los explantes de plantas madre de encino que pudieron ser colectados durante las temporadas mencionadas corresponden a las especies: *Q. eduardii*, *Q. resinosa*, *Q. rugosa*, *Q. laeta*, *Q. grisea*, *Q. castanea* y *Q. potosina*.

El número de explantes para cada una de las especies fue diferente dependiendo de la producción que hubo y una vez obtenidos los explantes iniciales, en el laboratorio se procedió a la desinfección de los mismos. Como se sabe, el paso inicial en el proceso de micropropagación es obtener cultivos asépticos del material vegetal seleccionado. Este objetivo es usualmente difícil de alcanzar cuando se usa material de campo, según señalan Romano y Martins – Loução (1992).

Para el caso de *Quercus* spp. los protocolos de desinfección generados de proyectos anteriores en la Universidad Autónoma de Aguascalientes funcionaron adecuadamente para la mayoría de las especies como se observa en el Cuadro 5 y arrojaron resultados de 53 y 56 % para *Q. potosina* y *Q. laeta*, respectivamente, seguidos por 87% para *Q. resinosa* y *Q. rugosa*, 89% para *Q. eduardii*, y los mejores resultados de desinfección los mostraron *Q. laeta* y *Q. grisea* con un 100%. En los casos en los cuales se presentó contaminación fue principalmente debida a hongos y bacterias contenidos en los explantes iniciales. La contaminación representó un gran problema para algunos casos y se agravó para las especies en que la producción de compuestos fenólicos fue mayor especialmente después del uso de agentes desinfectantes como lo señala Romano y Martins – Loução (1992) o durante la escisión de los explantes; aún cuando se usaron una solución antioxidante compuesta por ácido ascórbico y ácido cítrico, así como la adición de PVP que es un agente secuestrante de fenoles al medio de cultivo, la oxidación se siguió presentando sobre todo para *Q. laeta* y *Q. grisea* como se puede observar en las Figuras 15 y 16.

Para *L. glaucescens*, por el contrario, los protocolos establecidos no funcionaron debido a la persistencia de un hongo endófito cuya imagen se puede observar invadiendo las semillas en la Figura 12, por lo que fue necesario montar experimentos de prueba variando las concentraciones de los agentes desinfectantes y el uso de agentes antifúngicos para controlar dicho contaminante. Sin embargo, algunos de los tratamientos fueron muy drásticos ya que incluso se usaron concentraciones al 100% del desinfectante comercial con cloro, y esto provocó a su vez la producción excesiva de compuestos fenólicos también para esta especie leñosa lo cual corroboró nuevamente lo citado por Romano y Martins – Loução (1992).

Para asegurar la confiabilidad de la eliminación del hongo endófito, se realizaron dos inoculaciones en un período de tiempo de siete a nueve días entre cada una, y para la segunda inoculación se utilizaron dos medios de cultivo, A y B diferentes entre sí; el medio A consistió en medio MS, pH 5.7, adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar y 4 g L⁻¹ de carbón activado (CA); el medio B consistió en MS, pH 5.7, adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar, 1 mg L⁻¹ de benciladenina, 1 mg L⁻¹ de cinetina y 1 mg L⁻¹ de PVP. El medio A que no contenía ningún tipo de regulador de crecimiento vegetal estaba pensado para obtener plántulas, mientras que el medio B induciría la embriogénesis somática. Pese a esto, se observó la persistencia del hongo en algunos de los tratamientos como se ve en el Cuadro 6, por ejemplo, para el tratamiento 2 que durante la primera inoculación tuvo el mejor resultado de desinfección (87.5 %), después de la segunda inoculación presentó contaminación en la totalidad de los explantes; para los tratamientos 1, 4, 5 y 6 se tuvieron diferentes porcentajes de desinfección (42.9, 50, 10 y 10, respectivamente) durante la primera inoculación y después de la segunda inoculación no se presentó el hongo sin embargo para todos estos tratamientos la oxidación a causa del propio tratamiento fue severa; los tratamientos 7, 8 y 9 generaron porcentajes de desinfección de 41.7, 40 y 57.5 % respectivamente, sin embargo en la segunda inoculación los porcentajes de contaminación permanecieron altos para los tratamientos 7 y 8, mientras que para el tratamiento 9 fueron del 24% en medio A, y 27% en medio B.

Además de estos resultados obtenidos para el tratamiento 9, también se observó que los explantes presentaban menor oxidación. Debido a estos resultados aunados a la falta de

respuesta en medio B, se tomó como medio de cultivo el A y como protocolo de desinfección el tratamiento 9 (cuya parte medular consiste en la aplicación de blanqueador comercial al 60% por 60 min) para el resto de los explantes obtenidos y posteriores etapas del proyecto, lográndose un porcentaje de desinfección del 71.5% en la primera inoculación y un 87.5% en la segunda que se aprecia en el Cuadro 7.

Además del uso de agentes antioxidantes y PVP, todos los cultivos tanto de *Quercus* spp. como de *L. glaucescens* se colocaron inicialmente en oscuridad ya que la actividad de las enzimas encargadas de la biosíntesis y oxidación de fenoles se incrementa con la luz como señaló Azofeifa (2009). Estas respuestas de oxidación han sido observadas por varios autores y representan un gran problema en la micropropagación de estas especies tal es el caso de Romano Martins – Loução (1992) que señaló que el uso de PVP y soluciones antioxidantes tiene diversos efectos, mientras que funciona para algunas especies como *Q. robur* y *Q. petraea*, para *Q. suber* no funcionó.

Una vez que se tuvieron los cultivos asépticos, se requirió un tiempo en el cual se pudieran germinar las semillas y otro tanto para lograr obtener brotes bien fuera por la intervención de regulador de crecimiento vegetal BA (como fue el caso de *Quercus* spp.) o por la estimulación de las yemas axilares al cortar la parte apical de la planta (como fue el caso de *L. glaucescens*). La brotación múltiple por efecto de la BA se aprecia claramente en las Figuras 13, 14, 15 y 18.

Para el caso de *Quercus* spp. los resultados de la germinación que se muestran en el Cuadro 8 se tomaron a los 22 días y muestran que a pesar de pertenecer a un género, cada una de las especies tratadas produjo una respuesta de germinación diferente siendo *Q. laeta* la especie con menor respuesta de germinación con un 0.7%, seguida de *Q. potosina* con un 8.5%, *Q. resinosa* 29.6%, *Q. rugosa* 36.1%, *Q. eduardii* 46.5%, *Q. grisea* 55.6% y *Q. castanea* 87.5%. Para las dos primeras especies mencionadas anteriormente, los resultados del número de brotes por explante tampoco fueron favorables (0 y 0.1 %, respectivamente).

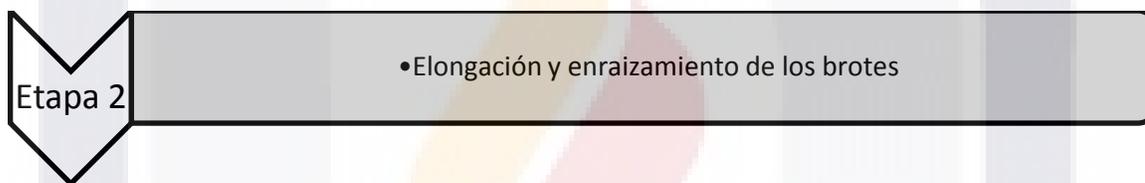
Cabe mencionar que la respuesta de germinación no necesariamente implica una relación directa con el número de brotes por explante ya que la respuesta a la citoquinina benciladenina

para la brotación múltiple fue diferente entre cada especie, resultados que también se aprecian en el Cuadro 8 ; tal es el caso de *Q. eduardii* que a pesar de no tener un porcentaje de germinación muy alto, sí fue la especie que mostró mejores resultados al producir *ca.* 3 brotes por explante así como *Q. rugosa* al producir *ca.* 2 brotes por explante; *Q. castanea* produjo muy pocos brotes por explante (0.5) y dado que esta especie no había sido probada antes, generó más embriones somáticos en estado asincrónico que brotes (los resultados de la embriogénesis somática se muestran en el Cuadro 9), además dichos brotes no fueron funcionales ya que no desarrollaron hojas como se puede observar en la Figura 19. *Q. grisea* mostró una respuesta de germinación muy parecida a *Q. eduardii* sin embargo fue también la especie más afectada por la exudación de compuestos fenólicos que aun cuando se tuvieron brotes por explante (0.6) no se desarrollaron; *Q. resinosa* presentó resultados similares con 0.7 brotes por explante. Los resultados del número de brotes se tomaron de 45 a 60 días después de la inoculación, sin embargo, al realizar la escisión de los mismos (principalmente del brote apical en el primer corte) aún pasado este tiempo, se continuaron obteniendo brotes sólo que se observó que la respuesta en la siguiente etapa se ve disminuida a medida que se utilizan brotes de un segundo o tercer corte.

Para *L. glaucescens* la obtención de brotes se realizó por medio del corte apical y con ello la estimulación de las yemas laterales en plántulas provenientes de la germinación de semillas en condiciones axénicas como se presenta en la Figura 21. Para poder llegar a lo anterior, como se mencionó anteriormente se realizaron varios tratamientos de desinfección; la respuesta de germinación de semillas producto de estos tratamientos fue nula en todos los casos excepto para el tratamiento 9, en el cual se obtuvo un 24%. Esta fue una razón más para elegir como protocolo de desinfección dicho tratamiento. Cuando se inició la desinfección masiva de semillas de laurel, con un número mayor de explantes, el porcentaje de germinación que se muestra en el Cuadro 11 fue muy cercano al anteriormente mencionado, con un 21%.

Comparando los resultados para las especies germinadas *in vivo* cuyos resultados se muestran en el Cuadro 24, se puede observar que en el caso de los encinos, la germinación es mayor con el tratamiento 2 *i. e.*, turba con micorriza comercial: *Q. resinosa* con un porcentaje de germinación con el tratamiento 2 (28.9 %) es muy parecido al obtenido por medio de germinación *in vitro* (29.6%); para *Q. eduardii* germinada *in vivo* ambos tratamientos arrojaron resultados muy

parecidos: 37.5% para el tratamiento 1 (turba) y 39.1% para el tratamiento 2, sin embargo la germinación *in vitro* presenta mejores resultados para esta especie con un 46.5%; para *Q. potosina* sucedió lo contrario, hubo una gran diferencia entre el porcentaje de germinación *in vivo* con el tratamiento 1 (6.3%) y el tratamiento 2 (47.5%), y los resultados de germinación *in vitro* coinciden más con el tratamiento 1 y se pueden considerar bajos (8.5%). Sin embargo, en el caso de laurel, la germinación *in vivo* arrojó un resultado de 23.4% para el tratamiento 1 y de 8.1% para el tratamiento 2, y el resultado *in vitro* es más cercano al primero con un 21%. Estos resultados sugieren que la inoculación micorrícica *in vivo* con la especie arbuscular *G. intraradices* de alguna manera mejora el suelo para que sea posible aumentar la germinación, ya que como menciona Aguirre-Medina (2009) la familia Fagaceae a la cual pertenece el género *Quercus* es colonizada por otro tipo de hongos, llamados ectomicorrícicos, por tanto es necesario en proyectos futuros profundizar en el estudio de este comportamiento.



Obtenidos los brotes de las especies que respondieron al establecimiento de cultivos axénicos, y una vez que dichos brotes alcanzaron de 2 a 4 cm, fueron escindidos para ser inoculados en un medio de cultivo que estimulara la formación de raíces. La rizogénesis fue inducida al cambiar los brotes del medio que contenía la citocinina BA, a un medio con la auxina IBA, por períodos de tiempo variables de entre dos a siete días, y posteriormente transferidos a medio MS_{1/2} libre de reguladores de crecimiento vegetal. Los períodos de tiempo fueron variables debido a que algunas especies formaron raíces más tempranamente que otras e incluso pudo notarse, específicamente para el caso de *Q. eduardii* que un período mayor a 48 horas en el medio de cultivo con IBA da como respuesta la formación de callo basal en el brote.

Se pudo observar que la capacidad de los brotes de las diferentes especies para formar raíces es diferente por lo que se puede decir que está influenciada por diferencias en los genotipos y en general para las especies leñosas con que se trabajó en este proyecto durante la etapa del

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

enraizamiento se presentaron varios problemas: los brotes al momento de ser escindidos generaron la exudación de compuestos fenólicos en el área de corte; después de la exposición a IBA, algunos brotes generaron callo basal y/o vitrificación, lo cual influyó no sólo en la respuesta al enraizamiento, sino en la calidad de las raíces formadas y consecuentemente en el desarrollo funcional de dichas raíces al momento del trasplante en la etapas posteriores; también fue posible observar que para *Quercus* spp., si los brotes enraizados se mantienen en medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento por más de tres semanas, se produce necrosis en la parte apical de los explantes, y posteriormente se extiende hacia el resto del explante lo cual conduce a la muerte del mismo. Por esta razón, aquellos brotes enraizados de las diferentes especies de encino sólo se mantuvieron en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento de 3 a máximo 4 semanas.

De los encinos, la especie que mostró mejor respuesta al enraizamiento fue *Q. eduardii* con un 69.6%, seguida de *Q. resinosa* con un 44.5%. Ambas especies formaron ca. 5 raíces por explante, sin embargo las de *Q. eduardii* lograron desarrollarse más y alcanzaron longitudes de 4.1 cm (± 0.21) lo cual se observa en la Figura 23, en tanto que las de *Q. resinosa* alcanzaron sólo 1.4 cm (± 0.29) que se observa en la Figura 26. Respecto a *Q. rugosa* y *Q. grisea*, que fueron las especies de las cuales se pudieron obtener brotes que alcanzaran tallas para ser probados en esta etapa, la respuesta de enraizamiento fue muy baja, con 2.9% para la primera y nula para la última; además, las raíces que se formaron en pocos explantes de *Q. rugosa* alcanzaron longitudes muy pequeñas, 0.8 cm (± 0.54) y no se desarrollaron posteriormente como se puede observar en las Figuras 24 y 25. Los resultados numéricos se aprecian claramente en el Cuadro 13.

Para el caso de laurel se probaron varias concentraciones de IBA así como tiempos de exposición al mismo; el resumen de los tratamientos se puede ver en el Cuadro 4. Se observa en el Cuadro 14 que las altas concentraciones e. g. 5, 10 y 20 mg L⁻¹ (tratamiento 6) provocaron que los brotes se necrosaran y que las bajas concentraciones e. g. 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg L⁻¹ (tratamiento 2 y 3) generan muy baja respuesta al enraizamiento y los pocos brotes que enraízan tienen pocas raíces por explante (ca. 0.6 a 1). Cuando estas bajas concentraciones fueron acompañadas de tiempos de exposición mayores, la respuesta al enraizamiento se mejoró hasta alcanzar el mejor resultado de 60% en el tratamiento 4, al exponer a los brotes por 30 días a una concentración de

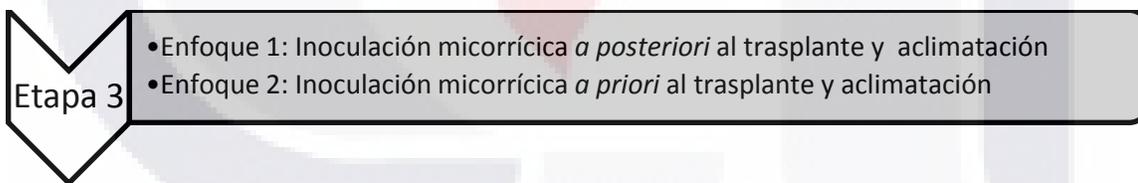
TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

IBA de 1.0 mg L^{-1} y las raíces formadas fueron *ca.* 2 con una longitud de 1.3 cm en el momento en que se tomaron los resultados, es decir, 30 días después de la inoculación en medio sin RCV; estas raíces a diferencia de los encinos, sí continuaron desarrollándose y al momento del trasplante ya habían aumentado su longitud; la observación de este resultado se aprecia en la Figura 30. Respecto al tratamiento 5, a una concentración de 2.5 mg L^{-1} se alcanza una respuesta de 40% y las raíces por explante mostraron mayor resultado que el tratamiento 4, sin embargo, estos brotes enraizados mostraron formación de callo basal y no fueron adecuados para las siguientes etapas del proyecto.

Los resultados tanto de encino como de laurel corroboran lo citado por varios autores (Marks *et al.*, 2000; Király *et. ál.*, 2001; Nandi *et al.*, 2002; Giri *et al.*, 2004; Vieitez *et al.*, 2009) respecto a la dificultad del enraizamiento de especies leñosas y el efecto negativo que impacta sobre la micropropagación de estas especies. Algunas soluciones propuestas por estos autores tales como reducir el tiempo de exposición al RCV, disminución de la concentración de sales en los medios de cultivo, reducción o ausencia en la concentración de citocininas y aumento de auxinas, seguido de la inoculación en medios libres de RCV, se aplicaron a las especies de interés de este proyecto. Pese a esto, sólo pudieron lograrse brotes de *Q. eduardii*, *Q. resinosa*, *L. glaucescens* y algunos pocos de *Q. rugosa*, y como señala Marks *et al.* (2000) la emergencia de raíces carece de sincronía.

Otro de los problemas que influyó en esta etapa del proyecto se mencionó anteriormente durante la generación de brotes fue la hiperhidratación que se aprecia claramente en la Figura 27. Este fenómeno fue previamente conocido y descrito bajo el término vitrificación. Los así llamados brotes vitrificados, vítreos o hiperhidratados, parecen turgentes, húmedos en su superficie e hipolignificados. Sus órganos son de algún modo traslúcidos, en algunos casos menos verdes y fácilmente quebradizos (Kevers *et ál.*, 2004). Para las especies de interés de este proyecto fue posible observar que los brotes vitrificados responden al enraizamiento muy pobremente, y cuando lo hacen, presentan formación de tejido calloso o bien, durante la etapa siguiente (aclimatación) en ningún caso lograron sobrevivir.

Los resultados de enraizamiento obtenidos por García *et ál.* (2010) para *Q. ilex* L. en condiciones *in vitro* fueron de 28 a 40%, que coinciden con algunos de los resultados de las especies de este proyecto, mientras que contrastan con Nandi *et ál.* (2002) que obtuvo para *Q. leucotrichophora* y *Q. glauca* cerca de 90% y 100% de respuesta al enraizamiento, resultados muy superiores a los obtenidos para los encinos de este proyecto. También para *Q. suber*, Martins – Loução *et al.* (1995) lograron obtener 100% de enraizamiento al probar diferentes concentraciones de fuentes de carbono en forma de carbohidratos en los medios de cultivo ya que como señala este autor, la iniciación y crecimiento radicular son procesos que requieren alta energía que puede ocurrir a expensa de sustratos metabólicos disponibles. Chalupa (1984) también logró obtener entre 80 y 100% de enraizamiento para *Q. robur* L. Estos resultados si bien son contrarios a los obtenidos para las especies de interés del proyecto, dan el precedente de que es posible lograrlo sólo se requiere más experimentación. Además, la respuesta de enraizamiento es sumamente importante para lograr el éxito durante la aclimatación a condiciones autotróficas de las especies generadas *in vitro*.



El uso extensivo de la micropropagación es restringido por el alto porcentaje de plantas que son transferidas a condiciones *ex vitro*. Bajo condiciones *in vitro* las plantas crecen en niveles de iridiscencia bajos, condiciones asépticas, en medio conteniendo suficiente azúcar y nutrientes que permiten el crecimiento heterotrófico y en una atmósfera con un alto nivel de humedad. Estas condiciones llevan a la formación de plántulas que difieren en términos de morfología, anatomía y fisiología de las plantas crecidas naturalmente, resultando en una escasa supervivencia bajo condiciones de ambientes naturales cuando son transferidas de las condiciones *in vitro* (Pospisilova *et al.*, 1999 ;Rai *et al.*, 2011). Por otro lado, de manera natural, las plantas forman

asociaciones simbióticas con varias especies de microorganismos entre las que se encuentran los hongos micorrícicos y se sabe que éstos confieren resistencia a la planta ante diversas situaciones bien sea de estrés por factores bióticos o abióticos; por tales motivos, se ha utilizado la micorrización (incorporación de un inóculo micorrícico) a las técnicas de cultivo de tejidos para incrementar las respuestas positivas durante el cambio a condiciones *ex vitro*.

Esta etapa del proyecto consistió en dos puntos. Ambos consistieron en la inoculación micorrícica sin embargo se realizó de dos formas diferentes que se describieron como enfoque 1 y enfoque 2 en la metodología. Para el enfoque 1, se colectaron muestras de los suelos de bosques de encino hábitat de las plantas madre seleccionadas en la etapa 1; estas muestras de suelo fueron tomadas cerca de las raíces de las plantas madre y constituyeron lo que se denomina “inóculo bruto” en el sentido de que de manera natural en el suelo existe una mezcla de microorganismos que benefician el desarrollo de la planta. Por otro lado, también se contaba con una endomicorriza arbuscular comercial cuya descripción se encuentra en el anexo B, en forma de esporas de la especie *G. intraradices*.

Tanto el inóculo bruto como la micorriza comercial fueron probadas en este enfoque bien sea en una mezcla con el sustrato turba, o directamente en el caso del inóculo bruto, después de tener las plantas generadas *in vitro* libres de medio de cultivo y listas para trasplantarse sobre estos sustratos, *i. e.*, la inoculación micorrícica se realizó después del trasplante en condiciones *in vivo*. Para el enfoque 2, por el contrario, la inoculación micorrícica se realizó antes del trasplante y en condiciones *in vitro* aún y consistió en colocar las plantas generadas *in vitro* en contacto con una solución llamada aislado de esporas.

Los aislados de esporas tanto de las muestras silvestres como de la micorriza comercial se obtuvieron mediante el protocolo descrito en la Figura 5. Después de esto, una vez obtenidos todos los aislados se realizó un conteo de las esporas obtenidas por medio de una tinción y observación al microscopio como se muestra en la Figura 34. Los resultados del conteo se señalan en el Cuadro 19. En los aislados de muestras de campo, como era de esperarse, pudieron observarse diferentes tipos de esporas debido a la naturaleza de la muestra; no se realizó la identificación de éstas en el supuesto de que, al igual que en el inóculo bruto del enfoque 1,

existen una variedad de microorganismos que están presentes en el suelo y actúan beneficiando a las especies vegetales por lo que de igual manera en el aislado debían existir esporas que tuvieran impacto positivo sobre la supervivencia de las plantas generadas *in vitro* en el trasplante.

Se evaluaron dos respuestas: la supervivencia al trasplante y el crecimiento relativo de las plantas generadas *in vitro* en un período de 28 días con intervalos de 7 días, para hacer un total de 4 observaciones. El tamaño de la muestra como se mencionó anteriormente fue diferente en cada tratamiento debido a que depende del número de plantas obtenidas en la etapa anterior.

Los resultados en el enfoque 1 para la especie *Q. eduardii* se aprecian en el Cuadro 15 muestran que a los 7 días no hay mucha diferencia entre tratamientos y se encuentran supervivencias entre 60 a 70%, aunque sí se nota que en el tratamiento 3 (sustrato turba con la micorriza comercial) se tiene la mayor supervivencia. A los 14 días, este tratamiento y el número 1 (sustrato turba) muestran la misma tendencia con 33% de supervivencia, mientras que los tratamientos 2 (turba con inóculo bruto) y 4 (inóculo bruto) mostraron descensos. A los 21 días, el único tratamiento que registró supervivencia fue el 3 con un 5%, y finalmente en la última observación no se logró aclimatar plantas de esta especie. Durante este período también se fue registrando si había algún crecimiento respecto al tamaño inicial de la planta al momento de trasplantar, sin embargo los resultados obtenidos mostrados en el Cuadro 16 indican que bajo este enfoque no hubo diferencia en el tamaño final respecto al inicial, lo cual en los cuadros se presenta como 1.00, esto es, no hubo crecimiento de *Q. eduardii* bajo este enfoque.

Respecto a *L. glaucescens* en el enfoque 1, se contaba con muy pocos brotes enraizados debido a que la etapa 1 demandó mucho tiempo y se presentaron muchas dificultades en el establecimiento de los cultivos axénicos, y como se mencionó al inicio de las discusiones, cada etapa siguiente depende de la anterior en el sentido de que de ella se genera el material con el que se trabaja en la etapa posterior. De lo anterior, sólo se montaron dos tratamientos para laurel en el enfoque 1, en sustrato turba (tratamiento 1) y en sustrato turba con la micorriza comercial (2). Como se puede observar en el Cuadro 17, a los 7 días del trasplante, los resultados de supervivencia son iguales en los tratamientos con un 80%, a los 14 días se empieza a notar un

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

descenso en el tratamiento 1, con un 40% respecto a un 60% en el tratamiento 2, a los 21 días sólo hubo supervivencia del 20% en el tratamiento 2, y finalmente a los 28 días no se logró la aclimatación de ninguna planta. En lo que respecta al crecimiento para esta especie, el Cuadro 18 indica que permaneció con el mismo tamaño durante el período de tiempo de supervivencia, es decir, no hubo crecimiento relativo.

Al comparar los resultados de *Q. eduardii* y *L. glaucescens* en este enfoque se puede observar que el comportamiento de los resultados es el mismo, y dado que para laurel no se utilizó inóculo bruto, se puede decir que la resistencia que muestra la planta es de hecho, debida a la micorriza comercial en el sustrato, y por tanto, se puede también decir que en el caso de *Q. eduardii* es muy posible que también se deba a esto. Cabe mencionar que a pesar de ser menor la cantidad de plantas en la muestra para *L. glaucescens*, los porcentajes de supervivencia son mayores en todos los intervalos de tiempo en que se tomaron resultados, respecto de *Q. eduardii*.

Aún cuando se sabe que las especies *Quercus* forman más bien asociaciones con hongos ectomicorrícicos, por los resultados anteriores se puede decir que de alguna manera la endomicorriza comercial le da cierta resistencia que hace que su período de supervivencia sea mayor en presencia de la misma que con otros tratamientos, o bien, que el inóculo bruto contiene demasiados microorganismos que la planta generada *in vitro* no alcanza a asimilar por lo que entra en estrés y disminuye su resistencia al trasplante. Además de estas observaciones, Egerton *et ál.* (2011) señala que aún cuando la mayoría de las plantas establecen bien sea ectomicorrizas o micorrizas arbusculares, periódicamente co-ocurren en la raíz como duales (co-dominantes) o sucesionales, y existen datos que indican que las hifas extra e intraradicales y vesículas típicas de hongos Glomales (orden de hongos micorrícicos a la que pertenece *G. intraradices*) se presentan en las raíces de plántulas *Fagus* y *Quercus*. Respecto a lo anterior, también He *et. ál.* (2010) indica que cuatro especies Fagaceae fueron encontradas asociándose con 10 especies de hongos que pertenecían a cuatro géneros entre los que estaba *Glomus*.

En el enfoque 2, los resultados para *Q. eduardii* se señalan en el Cuadro 20 y muestran primeramente que la inoculación *a priori* al trasplante tiene mejores resultados ya que a los 7 días después del trasplante, la totalidad de las plantas presentó supervivencia, pese a que en los

intervalos siguientes también muestra un comportamiento de descenso en la supervivencia, siendo el caso del tratamiento 1 (control: exposición de las raíces a agua destilada) el más crítico donde de un 100% que se registró a los 7 días descendió hasta un 0% de supervivencia a los 14 días, mientras que en los demás tratamientos se mantuvo en un 66.7% para los tratamientos 2 y 3 (aislados de esporas de laurel y encino, respectivamente) y 50% para el tratamiento 4 (aislado de esporas de micorriza comercial). A los 21 días, sólo el tratamiento 3 mostró resultados de supervivencia con un 33.3% que se mantuvo también en la última observación. Lo importante en este punto es que con este enfoque, a los 21 días empezó a presentarse crecimiento en las plántulas supervivientes, y para este caso de *Q. eduardii*, el crecimiento relativo fue considerable ya que alcanzó valores de 1.25 a los 21 días y de 1.50 a los 28 días, y recordando que el crecimiento relativo se obtiene al dividir el tamaño final entre el tamaño inicial de la planta al momento del trasplante, estos valores indican que al final de las observaciones las plantas aumentaron su tamaño 1.5 veces respecto al tamaño inicial, lo cual se observa claramente en la Figura 35.

Los resultados obtenidos corroboran el hecho de que la transferencia a condiciones *ex vitro* es un paso crítico, además, la posible causa de los bajos resultados de supervivencia puede ser que los explantes obtenidos hayan tenido malformaciones sobre todo a nivel de producción de cera de la cutícula en las hojas, o bien pocos estomas ya que como señala Kevers *et al.* (2004) la mayoría de los estomas de hojas de plantas *in vitro* no parecen tener un mecanismo de cerrado. Esto puede ser la causa principal de la rápida pérdida de agua, y muerte durante la aclimatación a baja humedad relativa.

De lo anterior se desprende la posibilidad de estudiar en futuros proyectos la morfología de las especies *Quercus* y *L. glaucescens* así como la identificación y aislamiento de las micorrizas que se encuentran en las soluciones utilizadas como inóculos para el presente proyecto. Si bien hay varios métodos tradicionales como el aislamiento de hongos de muestras por dilución serial, identificaciones microscópicas, etc., éstas forman sólo la parte preliminar de la identificación como señala Varma y Kharkwal (2009), actualmente los métodos moleculares por secuenciación, comparación en bases de datos, alineamiento y colocación filogenética aparecen como herramientas poderosas para complementar el presente trabajo. Además, una nueva generación

de sistemas de cultivo llamados PM (photoautotrophic micropropagation) en combinación con micorrización (sistema de cultivo micorrización – PM) podrían ser una alternativa para lograr la promoción de supervivencia y salud en plántulas micropropagadas. Además, la utilización de ácido absísico durante la etapa de aclimatación se presenta también como una nueva herramienta ya que como señala Rai *et al.* (2011) este regulador de crecimiento actúa como un anti transpirante durante la aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* y reduce la pérdida de agua de las hojas durante el trasplante incluso cuando están presentes estomas no funcionales, asimismo también menciona que Pospisilova *et al.* (2009) recientemente reportaron que la adición de ABA al último subcultivo mejoró la tasa de supervivencia en plantas de tabaco transferidas a condiciones ambientales naturales. Un número de otros reportes también documentan el papel significativo del ABA en la aclimatación de plantas producidas por cultivo de tejidos.

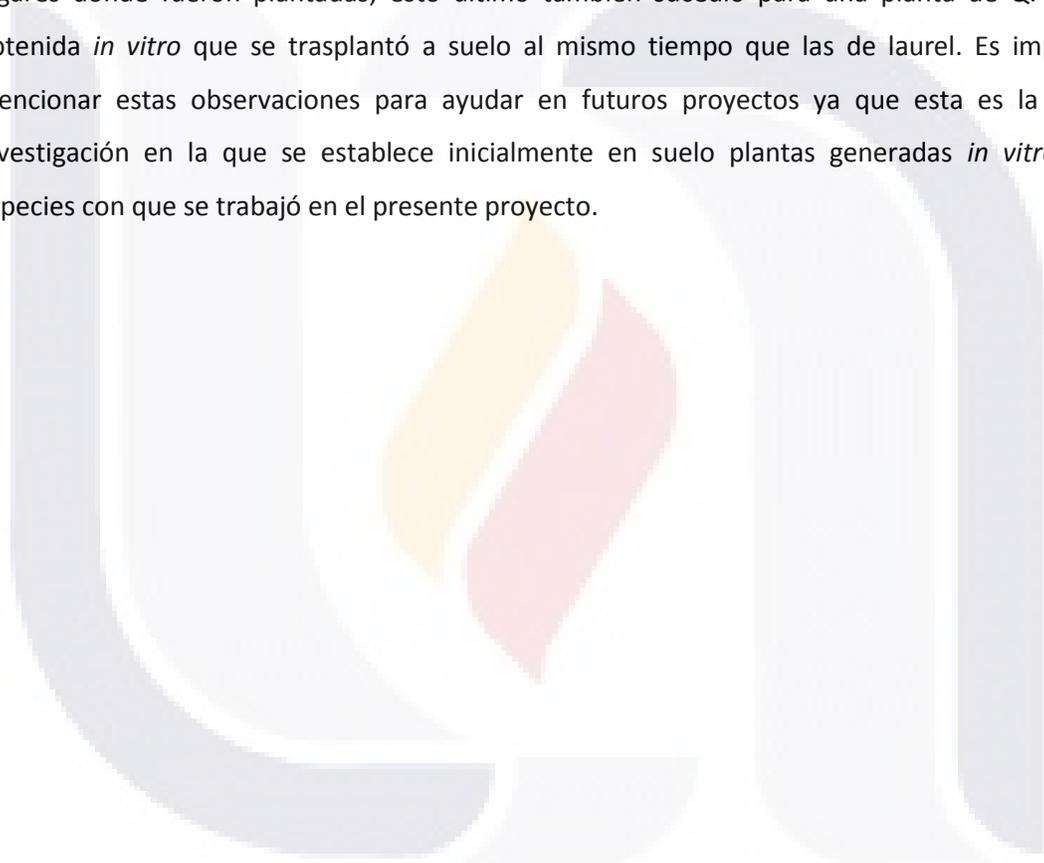
Etapa 4

- Establecimiento inicial en suelo de las plantas generadas *in vitro* de especies de interés forestal (*Quercus* spp. y *Litsea glaucescens*) en la estación biológica "Agua Zarca"

A partir de los resultados de la etapa anterior, se generaron las plantas de las especies *L. glaucescens* y *Q. eduardii* para probar esta última etapa del proyecto que consistió en que una vez aclimatadas las plantas generadas *in vitro*, después de un período de tiempo de aproximadamente 3 a 4 meses, dichas plantas se trasladaron a la Estación Biológica "Agua Zarca" de la Universidad Autónoma de Aguascalientes y se hizo el establecimiento inicial en suelo.

Fue necesario esperar un período de 3 a 4 meses en el que las plantas siguieran creciendo para ser más resistentes a los cambios ambientales drásticos de las condiciones de invernadero, sistema cerrado con cierto control de estreses ambientales, a la condición en campo donde todos los factores, tanto bióticos como abióticos afectan a las plantas. En relación a esto, se esperaba la temporada de precipitación pluvial para eliminar uno de los estreses más significativos que es el

hídrico, sobre todo por los resultados durante la aclimatación en la etapa 3 del proyecto, donde la mayoría de las plantas no sobrevivieron y se observó desecación en la superficie foliar, aún cuando los riegos fueron abundantes. Sin embargo, finalmente las plantas fueron transferidas y establecidas inicialmente en suelo como se observa en la Figura 43 y se logró la supervivencia para dos de seis plantas de *L. glaucescens*, lo cual representa *ca.* 30% que se muestra en el Cuadro 25; cabe mencionar que sólo una de las seis plantas mostró marchitez y culminó en muerte, mientras que tres de las seis plantas fueron depredadas ya que se observaban huellas de saqueo en los lugares donde fueron plantadas; esto último también sucedió para una planta de *Q. eduardii* obtenida *in vitro* que se trasplantó a suelo al mismo tiempo que las de laurel. Es importante mencionar estas observaciones para ayudar en futuros proyectos ya que esta es la primera investigación en la que se establece inicialmente en suelo plantas generadas *in vitro* de las especies con que se trabajó en el presente proyecto.



8. CONCLUSIONES

Los resultados indican que es posible micropropagar especies leñosas de importancia para el estado de Aguascalientes como los son los encinos *Quercus* spp. y laurel *L. glaucescens* usando germinación de semillas *in vitro* en medios de cultivo adicionados con BA para obtener brotación múltiple, o bien, sin ningún regulador de crecimiento vegetal por estimulación de yemas axilares al cortar la parte apical en el caso de laurel.

Se logró la obtención de brotes generados *in vitro* de las especies *Q. eduardii*, *Q. resinosa*, *Q. rugosa*, *Q. grisea* y *Q. potosina*, de los cuales en los primeros tres se logró el enraizamiento, siendo *Q. eduardii* la especie que mejor responde tanto a la germinación y obtención de brotes por explante, como en el enraizamiento e inoculación micorrícica.

También se logró la obtención de brotes de *L. glaucescens* y de los tratamientos aplicados a para el enraizamiento, IBA fue mejor que ANA para inducir la respuesta y promedio del número de raíces por explante, aplicándolo en bajas concentraciones (1.0 mg L^{-1}) por un período de tiempo largo (30 días). Los tratamientos con mayor concentración y menor tiempo dan resultados similares pero la calidad del sistema radical es menor ya que se forma tejido calloso, vitrificación, entre otros problemas.

El enfoque 2, inoculación micorrícica *a priori* al trasplante a suelo arrojó mejores en relación a las respuestas del enfoque 1 tanto para *Q. eduardii* como para *L. glaucescens*.

Se logró establecer plantas generadas *in vitro* de la especie *L. glaucescens*, sin embargo, la transferencia a suelo sigue siendo un punto crítico en la micropropagación de estas especies de interés forestal.

9. ANEXO A. LISTA DE ABREVIATURAS

®	Marca registrada
° ' "	Grados, minutos, segundos
µl	Microlitros
µmol m ⁻² s ⁻¹	Micromoles por metro cuadrado por segundo
AC	Carbón activado (<i>inglés</i> : activated charcoal)
AMF	Hongos micorrícicos arbusculares (<i>inglés</i> : Arbuscular mycorrhizal fungi)
ANA	Ácido naftalenacético
BA	Benciladenina
CA	Carbón activado
ca.	Aproximadamente (<i>latín</i> : circa)
Captán	n-triclorometil-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
Dermoclean	n- alquil metil bencil cloruro de amonio
e. g.	Por ejemplo (<i>latín</i> : <i>exempli gratia</i>)
et al.	Varios autores (<i>latín</i> : <i>et álii</i>)
g L ⁻¹	Gramos por litro
h	Horas
i. e.	Es decir (<i>latín</i> : <i>id est</i>)
IBA	Ácido indolbutírico
KOH	Hidróxido de potasio
L	Litros
m	Metros
mg L ⁻¹	Miligramos por litro
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
MS	Medio Murashige y Skoog (en <i>Physiol Plant</i> 15:473–479, 1962)
MS _{1/2}	Medio Murashige y Skoog a la mitad de fuerza
msnm	Metros sobre el nivel del mar
n	Tamaño de la muestra
NOM -059- SEMARNAT 2001	Norma Oficial Mexicana 059, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales 2002, que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres, terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección.
PVP	Polivinilpirrolidona
RCV	Regulador de crecimiento vegetal
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo

10. ANEXO B. BIOFERTILIZANTE

Se denomina biofertilizante a un producto que contiene uno o varios microorganismos del suelo y puede ser aplicado a la semilla o al suelo con el fin de incrementar su número, asociarse directa o indirectamente al sistema radical de las plantas, favorecer su interacción e incrementar el desarrollo vegetal y reproductivo de la planta huésped (Aguirre-Medina *et al.*, 2009).

Dentro de estos microorganismos se encuentra un grupo de hongos habitantes del suelo, con capacidad de colonizar la raíz de un gran número de especies y establecer una simbiosis. El vocablo Micorriza, proviene de *mico* y *raíz* y significa la unión de la raíz de una planta con las hifas de determinados hongos. Se han descrito siete tipos de micorrizas siguiendo criterios estructurales, funcionales y taxonómicos y son: Ectomicorrizas, Endomicorrizas o Micorrizas Arbusculares, Ectoendomicorrizas, Arbutoides, Monotropoides, Ericoides y Orquidioides. Los hongos micorrícicos más usados como biofertilizante son los endófitos (endomicorrizas) (Aguirre-Medina *et al.*, 2009).

Durante la realización de este proyecto, se utilizó Biofertilizante INIFAP® que es un inoculante de hongos micorrizantes vesículo arbusculares adecuado para una gran variedad de especies. Cada kg de Biofertilizante INIFAP® contiene $\geq 60\ 000$ esporas de la cepa seleccionada de la especie *Glomus intraradices*.



Figura 44. Presentación del Biofertilizante INIFAP® (Micorriza comercial *Glomus intraradices*) [Tomado de Aguirre-Medina *et al.*, 2009].

11.GLOSARIO

Aclimatación:

Familiarización de un organismo vivo (planta, animal o microorganismo) a un cambio medioambiental que le somete a un estrés fisiológico (Jáuregui *et al.*, 2006).

Adventicia:

Estructura que se desarrolla fuera de su emplazamiento habitual, *e. g.*, brotes que se generan a partir de hojas o raíces, y embriones a partir de células distintas del cigoto (Jáuregui *et al.*, 2006).

Agar:

Polisacárido que por sus propiedades gelificantes, se utiliza en la preparación de medios nutritivos para los cultivos. Se obtiene de la *Rhodophyta* (alga roja). Tanto el tipo de agar como su concentración pueden afectar el crecimiento y la apariencia de los explantes cultivados (Jáuregui *et al.*, 2006).

Agente antifúngico:

Cualquier agente químico o biológico que impide el crecimiento o la supervivencia de hongos.

Biodiversidad:

Variedad de organismos vivos en el planeta; esto incluye, entre otras cosas, los ecosistemas terrestres y acuáticos, así como las diferentes especies microscópicas y macroscópicas y los genes que habitan en ellos. Es decir, todas las formas en que la vida se manifiesta en nuestro planeta (Referencia electrónica 4).

Biotecnología:

Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos en usos específicos (Referencia electrónica 3).

Callo:

Crecimiento desorganizado de células obtenido a partir de un determinado tejido. La formación de callo comienza con el aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente desdiferencian ante la presencia de auxina exógena en el medio de cultivo (Pérez, 1998).

Cultivo de tejidos:

Conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales. Constituye dentro de las biotecnologías, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado (Pérez, 1998).

Dominancia apical:

Fenómeno por el que la presencia de una yema terminal (apical) en la rama de una planta inhibe el crecimiento de las yemas laterales (axilares). Se explica por el efecto controlador de las auxinas procedentes de la yema terminal (Jáuregui *et al.*, 2006).

ES (Embriogénesis somática):

Formación de un embrión a partir de una célula sin la necesidad de la fusión de gametos (Pérez, 1998).

Especie:

Grupo de individuos que pueden reproducirse entre sí, obteniendo una descendencia fértil (Referencia electrónica 5).

Estéril:

Medio u objeto libre de microorganismos viables (Jáuregui *et al.*, 2006).

Esterilización por filtración:

Proceso para eliminar los contaminantes microbianos de un líquido, haciéndolo pasar a través de un filtro con un tamaño de poro suficientemente pequeño para impedir el paso de microorganismos y esporas (Jáuregui *et al.*, 2006).

Esterilización:

Eliminación de microorganismos mediante calor, radiación, filtración o mediante el uso de compuestos químicos (Jáuregui *et al.*, 2006).

Estoma:

Poros en la epidermis de la hoja o del tallo de una planta, que permite el intercambio de gases, incluyendo el vapor de agua, hacia y desde los espacios intercelulares (Jáuregui *et al.*, 2006).

Estrés:

Condiciones no óptimas para el crecimiento. El estrés puede estar provocado por factores bióticos (patógenos, plagas) y abióticos (del ambiente, como calor, sequía, etc.) [Jáuregui *et al.*, 2006].

Etanol:

Líquido de uso común para la desinfección de tejidos vegetales, utensilios de vidrio y superficies de trabajo en el manejo de los cultivos de tejidos (Jáuregui *et al.*, 2006).

Etiolación:

Aumento anormal de la elongación del tallo, acompañado de un escaso (o nulo) desarrollo de hojas. La elongación fisiológica es típica de plantas que crecen en condiciones de baja luminosidad o en completa oscuridad. También puede ser inducida por algunos hongos patógenos (Jáuregui *et al.*, 2006).

Género:

Grupo de especies estrechamente relacionadas. Aunque tales relaciones se sustentaban típicamente en semejanzas físicas, en la actualidad se complementan con datos de secuencias de ADN (Jáuregui *et al.*, 2006).

Genotipo:

Constitución genética, de uno o más genes, de un organismo en relación a un rasgo hereditario específico o a un conjunto de ellos (Referencia electrónica 3).

Germoplasma:

La variabilidad genética total, representada por células germinales, disponibles para una población particular de organismos (Referencia electrónica 3).

Marchitez:

Agostamiento de tallos y hojas, producido por la pérdida de turgencia celular. Puede tener su origen en un estrés hídrico o en alguna enfermedad (Jáuregui *et al.*, 2006).

Medio de cultivo:

Cualquier sistema nutritivo preparado para el cultivo de células, bacterias u otros organismos; generalmente es una mezcla compleja de nutrientes orgánicos e inorgánicos (Jáuregui *et al.*, 2006).

Micromoles por metro cuadrado por s ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$):

Número de fotones de una cierta longitud de onda incidente por unidad de área y por unidad de tiempo (Thimijan y Royal, 1982).

Microorganismo:

Organismos microscópicos pertenecientes por regla general a virus, bacterias, algas, hongos o protozoos (Referencia electrónica 3).

Organismo:

Entidad biológica capaz de reproducirse o de transferir material genético, incluyéndose dentro de este concepto a las entidades microbiológicas, sean o no celulares. Casi todo organismo está formado por células, que pueden agruparse en órganos, y éstos a su vez en sistemas, cada uno de los cuales realizan funciones específicas (Referencia electrónica 3).

Oxidación fenólica:

Aspecto común que presentan los tejidos vegetales como resultado de una herida. La oxidación fenólica suele manifestarse por un oscurecimiento del tejido y generalmente precede a la inhibición del crecimiento, o, en los casos graves, a la necrosis y muerte del tejido (Jáuregui *et al.*, 2006).

Planta madre:

Aquella de la cual se obtienen explantes y otros materiales de propagación (Jáuregui *et al.*, 2006).

Proliferación de brotes axilares:

Propagación de tejidos vegetales *in vitro* para promover el crecimiento axilar y generar un gran número de plántulas de cultivo (Jáuregui *et al.*, 2006).

Propagación:

Multiplicación de una planta completa a partir de una serie de materiales vegetativos. Su adaptación para cultivos *in vitro* se conoce como micropropagación (Jáuregui *et al.*, 2006).

Reguladores de crecimiento vegetal:

Grupo de sustancias orgánicas sintetizadas por la planta, que intervienen en diversos procesos fisiológicos en concentraciones muy bajas. Los cinco principales grupos son: auxinas, citoquininas, gibberelinas, etileno y ácido abscísico (Herrera *et al.*, 2006).

Totipotente:

Capaz de todo. Se aplica a las células que pueden dar origen a células de todos los órdenes (Referencia electrónica 3).

Zona radical:

Volumen de suelo o de un medio de crecimiento que contiene las raíces de una planta. En edafología, profundidad del perfil del suelo en el que normalmente se encuentran las raíces (Jáuregui *et al.*, 2006).

12.BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre-Medina, J. F., Irizar-Garza, M.B., Durán-Prado, A., Grajeda-Cabrera, O. A., Peña-del Río, M. A. y Loredó-Osti, C., Gutiérrez- Baeza, A., **2009**, Los Biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas, México. 86 p.
2. Azofeifa, A., **2009**, Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*, *Agronomía Mesoamericana* 20 (1): 153 – 175.
3. Bachman, G.R. y Metzger, J. D., **2008**, Growth of bedding plants in commercial potting substrate amended with vermicompost, *Bioresource Technology* 99: 3155 – 3161.
4. Bonga, J. M., Klimaszewska, K. K., **2010**, Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100: 241 - 254.
5. Cassells, A. C., Curry, R., **2001**, Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 64: 145 – 157.
6. Chalupa V., **1984**, In vitro propagation of Oak (*Quercus robur* L.) and Linden (*Tilia cordata* MILL.), *Biologia Plantarum* 26 (5): 374-377.
7. Chalupa V., **1988**, Large Scale Micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine – type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation, *Biologia Plantarum* 30 (6): 414 – 421.

8. Corral – Aguirre, J., Sánchez – Velásquez, L. R., **2006**, Seed ecology and germination treatments in *Magnolia dealbata*: An endangered species, *Flora* 201: 227 – 232.
9. De la Cerda-Lemus, M., **1999**, Encinos de Aguascalientes, Universidad Autónoma de Aguascalientes. ISBN 98-6259-07-4. 88 pp.
10. Egerton- Warburton y L., Allen, M., **2001**, Endo and ectomycorrhizas in *Quercus agrifolia* Nee. (Fagaceae): patterns of root colonization and efectos on seedling growth, *Mycorrhiza* 11: 283 – 290.
11. García, J. L., Liñán, J., Cantos, M., Troncoso, J., Fernández, A., Troncoso, A., **2010**, Some propagation methods for cloning holm oak (*Quercus ilex* L.) plants, *Central European Journal of Biology* 6 (3): 359 – 364.
12. García Molina, J. G., **2008**, Carbón de encino: fuente de calor y energía, CONABIO, *Biodiversitas* 77: 7-9.
13. Giri, C. C., Shyamkumar, B., Anjaneyulu, C., **2004**, Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview, *Trees* 18: 115 – 135.
14. Harrington, C. A., **1999**, Forests planted for ecosystem restoration or conservation, *New Forests* 17: 175 – 190.
15. He, X. H., Duan, Y., Chen Y. L., Xu, M. G., **2010**, A 60-year journey of mycorrhizal research in China: Past, present and future directions, *Sci China Life Sci* 53: 1374 – 1378.
16. Herrera, J., Alizaga , R., Guevara, E., Jiménez, V., **2006**, Germinación y crecimiento de la planta, Editorial UCR, Costa Rica, pp.56 -57.

17. Hohtola, A., Tóth, K., Haapala, T., **1994**, Alleviation of browning in oak explants by chemical pretreatments, *Biologia Plantarum* 36 (4): 511 -517.
18. Jáuregui, Rincón, J. y Chávez, Vela, N. A., **2006**, Glosario de Biotecnología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, 211 p.
19. Kapoor, R., Sharma, D., Bhatnagar, A. K., **2008**, Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications, *Scientia Horticulturae* 116: 227 – 239.
20. Kevers, C., Franck, T., Strasser, R., Dommès, J., Gaspar, T., **2004**, Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress – induced change of physiological state, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 77: 181 – 191.
21. Király, I., Balla, I., Jakab, J., Tamás, L., Sárvári, E., **2001**, Responses of the photosynthetic system and peroxidase activity to the rooting conditions of oak micropropagation, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66: 155 – 158.
22. Leiva, M. J., Fernández – Alés, R., **2005**, Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *Ballota*) acorns infestation by insects in Mediterranean dehesas and shrublands, *Forest Ecology and Management* 212 : 221 – 229.
23. Liu, W., Yang, Q., **2008**, Integration of mycorrhization and photoautotrophic micropropagation in vitro: feasibility analysis for mass production of mycorrhizal transplants and inoculants or arbuscular mycorrhizal fungi, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95: 131 – 139.
24. Lorea Hernández, F. G., **2002**, La familia Lauraceae en el sur de México: diversidad, distribución y estado de conservación, *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 71: 59 – 70.
25. Luna Vega, I., Alcántara Ayala, O., Contreras Medina, R., Ponce Vargas, A., **2006**, Biogeography, current knowledge and conservation of threatened vascular plants

- characteristic of Mexican temperate forests, *Biodiversity and Conservation* 15: 3773 – 3799.
26. Manzanera, J. A., Pardos, J. A., **1990**, Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21: 1 -8.
 27. Marks, T. y Simpson, S. E., **2000**, Interaction of explant type and índole-3-butyric acid during rooting in vitro in a range of difficult and easy-to root woody plants, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62: 65 – 74.
 28. Martins – Loução, M. A., Noronha, C., Romano, A., **1995**, Role of carbohydrates in micropropagation of coark oak, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40: 159 – 167.
 29. Mao, A. A., Wetten , A., Fay, M. F., Caligari, P. D. S. , **2000**, In vitro propagation of *Litsea cubeba* (Lours.) Pers., a multipurpose tree, *Plant Cell Reports* 19: 263 – 267.
 30. Nagendra, H. y Southworth, J. (eds.), **2010**, Reforesting Landscapes: Linking Pattern and Process, *Landscape Series 10*, Springer Science+Business Media B. V., pp. 92 – 98.
 31. Nandi Shymal K., Purohit, Vijay, K., Palni, Lok Man, S., Rikhari, Hem, C., **2002**, *In vitro* regeneration of *Quercus floribunda* Lindl. through cotyledonary nodes: an important tree of Central Himalaya, *Current Science*, Vol. 83 (3): 312 – 316.
 32. Ostrolucká, M. G., Gajdošová, A., Libiaková, G., **2007**, Protocol for micropropagation of *Quercus* spp., *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, Mohan S. y Häggman H. (eds.), Springer, pp. 85.
 33. Oyama, K., Scareli-Santos, C., Mondragón-Sánchez , M. L., Tóvar-Sánchez, E., Cuevas-Reyes, P., **2006**, Morphological variations of gall-forming insects on different species of oaks (*Quercus*) in Mexico, *Ecology and Conservation of Neotropical Montane Oak Forests* Vol. 185, Springer Berlin Heidelberg, pp. 259.
 34. Pérez Ponce, J. N. (ed.), 1998, Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba, 387 p.

35. Polle, A., Dučić, T., Berthold, D., Langenfeld-Heyser, R., Beese, F., **2009**, Mycorrhizal communities in relation to biomass production and nutrient use efficiency in two varieties of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* and var. *glauca*) in different forest soils, *Soil Biology & Biochemistry* 41: 742 -753.
36. Pospisilova , J., Kadlecěk, P., Tichá, I., Haisel, D., Plzakova, S., **1999**, Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions, *Biologia Plantarum* 42 (4): 481 – 497.
37. Rai, M. K., Shekhawat, N. S., Gupta, H., Phulwaria, M., Ram, K., Jaiswal, U., **2011**, The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, REVIEW, DOI 10.1007/s11240-011-9923-9.
38. Romano, A. y Martins – Loução, M. A., **1992**, Micropropagation of mature cork oak (*Quercus suber* L.): Establishment problems. *Scientia Gerundensis* 18:17-27.
39. Romo Díaz, B., Velásquez Valle, R., Siqueiros Delgado, M. E., Sánchez Martínez, G., De la Cerla Lemus, M., Moreno Rico, O., Pérez Molphe Balch, E., **2007**, Organismos con efecto potencial en el declinamiento de encinos de la Sierra Fría, Aguascalientes, México, *Investigación y Ciencia* 39: 11 – 19.
40. Thimijan, R. W. y Royal, D. H., **1982**, Photometric, Radiometric and Quantum Light Units of Measure: A Review of Procedures for Interconversion, *HortScience* 18: 818 - 822.
41. Van Staden, J. y Kowalski, B., **2001**, In vitro culture of two threatened South African medicinal trees – *Ocotea bullata* and *Warburgia salutaris*, *Plant Growth Regulation* 34: 223 – 228.
42. Valencia, A. S. y G. Flores-Franco, **2006**, Catálogo de Autoridad Taxonómica del género *Quercus*, Fagaceae en México, Facultad de Ciencias, UNAM, Base de Datos SNIB-CONABIO proyecto CS008, México, D.F.

43. Varma, A. y Kharkwal, A. C. (eds.), **2009**, Symbiotic Fungi, *Soil Biology* 18, Springer – Verlag Berlin Heidelberg, pp. 184.
44. Vengadesan, G. y Pijut, P. M., **2009**, Somatic emrbyogenesis and plant regeneration of northern red oak (*Quercus rubra* L.), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 97: 141 – 149.
45. Vieitez, A. M., Corredoira, E., Ballester, A., Muñoz, F., Durán, J., Ibarra, M., **2009**, In vitro regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 98 (2): 135-145.
46. Wenhui, Z., Xiaobo, X., Jianyun, Z., **2006**, Study on reproduction ecology of endangered species *Abies chensiensis*, *Acta Ecologica Sinica* 26 (8): 2417 – 2424.
47. Yao, Q., Wang, L. R., Zhu, H.H., Chen, J.Z., **2009**, Effect of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation on root system architecture of trifoliolate orange (*Poncirus trifolata* L. Raf.) seedlings, *Scientia Horticulturae* 121: 458 – 461.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

1. <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/LitseaGlaucescens.html>
2. http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/plantas/magnoliayMarg/Encinos/encinos.html
3. <http://www.monsanto.es/noticias-y-recursos/prensa/definiciones-de-t-rminos-t-cnicos/definiciones-de-t-rminos-t-cnicos>
4. <http://www.conabio.gob.mx/otros/comunicacion/doctos/biodiv.html>
5. http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion_internacional/doctos/glosario.html

