



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ÁREA ACADÉMICA DE INGENIERÍA FORESTAL**

**PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Prosopis laevigata* A PARTIR
DE YEMAS AXILARES**

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

INGENIERO EN MANEJO DE RECURSOS FORESTALES

PRESENTA

RAMIRO GONZÁLEZ AMADOR

TULANCINGO DE BRAVO, HIDALGO

SEPTIEMBRE 2009

La presente tesis titulada: “**PROPAGACIÓN in vitro DE *Prosopis laevigata* A PARTIR DE YEMAS AXILARES**” fue realizada por el pasante Ramiro González Amador bajo la dirección del comité revisor, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN MANEJO DE RECURSOS FORESTALES

COMITÉ REVISOR

DIRECTOR: _____
Dra. Juana Juárez Muñoz

ASESOR: _____
Dr. Leopoldo Mohedano Caballero

ASESOR: _____
Dra. Juana Fonseca González

ASESOR: _____
Dr. José Justo Mateo Sánchez

ASESOR: _____
Dr. Rodrigo Rodríguez Laguna

DEDICATORIA

A **Dios Todo poderoso**, por permitirme
llegar hasta esta etapa de mi vida

A mi madre **Rosalía Amador Hernández**
con todo mi amor, por su apoyo incondicional

A mi padre **José Perfecto Ramiro González López**,
por darme el ejemplo del trabajo

A mis hermanos

José Luís, Alexandro, César, Arturo, Alicia, Raul,
Andrés, Narciso, Reinaldo y Yuri Ana,
por su apoyo en los momentos en que se necesita de un amigo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estados de Hidalgo, por haberme permitido realizar mis estudios.

Al Instituto de Ciencias Agropecuarias, que por medio del Centro de Investigaciones Forestales, se pudo llevar a cabo esta investigación en el laboratorio de Biotecnología.

Al Programa de Mejoramiento de Profesorado (PROMEP), por el financiamiento económico de la investigación mediante el convenio PROMEP, Proyecto No. 100.5/03/1130.

A la Dra. Juana Juárez Muñoz, por su valiosa dirección durante el desarrollo de esta investigación, así como por su paciencia y comprensión en la revisión y asesoría del escrito.

Al Dr. Leopoldo Mohedano Caballero, por su asesoría y sugerencias en la corrección del manuscrito.

A la Dra. Juana Fonseca González, por su valiosa colaboración en la revisión de la tesis.

Al Dr. José Justo Mateo Sánchez, por su valiosa aportación cognoscitiva, su apoyo moral y su valiosa colaboración en la revisión de la tesis.

Al Dr. Rodrigo Rodríguez Laguna, por su asesoría y sugerencias en la corrección de la tesis.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron a la realización del presente estudio.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. ANTECEDENTES	3
3.1. Generalidades sobre el género <i>Prosopis</i>	3
3.1.1. Origen y distribución geográfica	3
3.1.2. Clasificación taxonómica	4
3.1.3. Descripción morfológica de <i>Prosopis laevigata</i>	6
3.2. Función ecológica del mezquite	8
3.3. Usos potenciales del mezquite	8
3.4. Tipos de reproducción	9
3.4.1. Reproducción sexual	9
3.4.2. Reproducción asexual	10
3.5. Macropropagación	10
3.6. Micropropagación	12
3.6.1. Organogénesis	13
3.6.2. Embrionogénesis	13
3.7. Factores que afectan el proceso morfogénético	14
3.8. Propagación <i>in vitro</i> de <i>Prosopis</i>	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1. Ubicación del experimento	19
4.2. Material biológico	19
4.3. Limpieza y escarificación de la semilla	20
4.4. Siembra	20
4.5. Medio de cultivo	20
4.5.1. Preparación del medio de cultivo	21

4.6. Selección y desinfección del material biológico	23
4.7. Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	23
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
5.1. Inducción de callos	24
5.2. Inducción de raíces	29
5.3. Desarrollo de brotes	35
5.4. Desarrollo de plantas	42
6. CONCLUSIONES	45
7. LITERATURA CITADA	46
8. APENDICES	58

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Medio de cultivo MS suplementado con diferentes concentraciones de auxinas, citocininas y giberelinas.	22
Cuadro 2.	Inducción de callo a partir de yemas axilares de <i>P. laevigata</i> provenientes de plantas de cuatro, seis, nueve y 14 meses de edad, cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes con 20 repeticiones por tratamiento.	28
Cuadro 3.	Inducción de la rizogénesis a partir de yemas axilares obtenidas de plantas de <i>P. laevigata</i> de cuatro, seis, nueve y 14 meses de edad, cada valor representa el promedio de tres repeticiones, con 20 explantes por tratamiento.	33
Cuadro 4.	Inducción de brotes a partir de yemas axilares tomadas de plantas de <i>P. laevigata</i> de cuatro, seis, nueve y 14 meses de edad, cada valor representa el promedio de tres repeticiones, con 20 explantes por tratamiento.	39

APÉNDICES

A.	Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962).	58
B.	Composición de las soluciones concentradas del medio Murashige y Skoog (MS).	59
C.	Soluciones para preparar un litro de medio Murashige y Skoog (MS).	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Prosopis laevigata</i> en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, Hgo.	7
Figura 2.	Aspecto de los callos desarrollados en explantes de plantas de <i>P. laevigata</i> de cuatro meses de edad, en el medios MS 16 (1mg/L AIB, 1 mg/L BAP) a los 30 días de incubación.	26
Figura 3.	Aspecto de raíces desarrolladas en explantes de <i>P. laevigata</i> de cuatro meses de edad, en los medios MS 9 (A) y MS 16 (B), a los 30 días de incubación.	30
Figura 4.	Efecto de la edad de la planta y la adición reguladores del crecimiento sobre la inducción de la rizogénesis en yemas axilares de <i>P. laevigata</i> , extraídas de plantas de cuatro, seis, nueve y 14 meses de edad, sembradas en medio MS.	34
Figura 5.	Porcentaje de brotes desarrollados a partir de yemas axilares de <i>P. laevigata</i> tomadas de plantas de cuatro, seis, nueve, y 14 meses de edad a los 30 días de incubación en medio MS.	40
Figura 6.	Brotación múltiple en yemas de plantas de <i>P. laevigata</i> de cuatro meses de edad, en el medio MS 9 (AIB 3mg/L), a los 30 días de incubación.	41
Figura 7.	Tamaño de los brotes desarrollados a partir de yemas de plantas de <i>P. laevigata</i> de cuatro meses de edad, en el medio MS 3 (ANA/KN 1.0/0.01mg/L) y MS 15 (AIA 3 mg/L) a los 30 días de incubación.	41

- Figura 8. Brotes con raíz desarrollados de yemas de plantas de *P. laevigata* de cuatro meses de edad, en el medio MS 15 (AIA 3 mg/L) y MS 16 (AIA/BAP 1/1 mg/L) a los 30 días de incubación. 43
- Figura 9. Efecto de la edad de la planta y la adición de reguladores del crecimiento sobre el desarrollo de plantas completas a partir de yemas axilares de *P. laevigata*, extraídas de plantas de cuatro, seis, nueve y 14 meses de edad, sembradas en medio MS. 44

ABREVIATURAS

AIA	Ácido Indolacético
AIB	Ácido Indolbutírico
ANA	Ácido α -naftalenacético
BA	N ⁶ - benciladenina
Kin	Cinetina
MS	Medio de cultivo MS (Murashige y Skoog)
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

RESUMEN

Las especies del género *Prosopis*, entre las que se incluye *P. laevigata*, tienen gran potencial de uso en programas de reforestación, ya que cumplen un papel muy importante contra la desertificación de suelos erosionados. Sin embargo, la regeneración en su hábitat natural es baja debido a que la semilla presenta características de resistencia física al medio, por lo que requiere de procesos como la escarificación para promover la germinación; ante esta situación la propagación vegetativa se vuelve una alternativa para regenerar la especie con fines de reforestación forestal. Con la idea de encontrar un método que permita la propagación masiva, se planteó evaluar el efecto de la edad del explante y el uso de reguladores de crecimiento en la micropropagación de *Prosopis laevigata*. Yemas de plantas de cuatro diferentes edades fueron sembradas en medio MS suplementado con auxinas, citocininas y giberelinas, solas o en combinaciones en rangos de concentración de 0.4 a 3 mg/L. La mejor respuesta en la inducción de callo, raíz, desarrollo de brotes y plantas completas, se observó en las yemas de plantas de cuatro meses de edad. En el medio MS 9 con AIB (3 mg/L) el 100% de los explantes desarrollaron callo, mientras que en el medio MS 15 con AIA (3mg/L) se obtuvieron los porcentajes más altos de inducción de raíces (100%), desarrollo de brotes (94%) y plantas completas (50%). Sin embargo, con el AIB (3mg/L) se indujo brotación múltiple (2 a 3 brotes). Los resultados indican que los explantes de plantas de cuatro meses de edad tiene un mayor potencial para la micropropagación masiva de esta especie y que el AIA es la mejor auxina para promover la inducción de callo, raíces, desarrollo de brotes y plantas.

ABSTRACT

Prosopis genus species including *P. laevigata* have a great potential to be including in reforestation programs, these play an important role against desertification in eroded soil. However, regeneration in its natural habitat is poor due to seed characteristics such as physical resistance to environment, so they need processes such as scarification to germinate; according to this, vegetative propagation becomes an alternative to regenerate the species for forest reforestation. For finding a mass propagation method and to assess the effect of explant age and the use of growth regulators in micropropagation of *Prosopis Laevigata*, this work was carried out, plant buds of four different ages cultured in Murashige y Skoog (MS) medium, supplemented with auxin, cytokinin and gibberellins, alone or mixed, in concentration ranges of 0.4 to 3 mg / L. The best response of callus, root, shoots and whole plant induction was observed in four months old buds. In the medium with IBA (3 mg / L) 100% of explants developed callus, whereas in the medium with IAA (3mg / L) the highest percentage of root induction (100%) development of shoots (94%) and plants (50%). AIB (3mg / L) induced multiple outbreak sprouting (2 to 3). Results indicate that four months age explants have a greater potential for mass micropropagation of this species and that IAA is the best auxin to promote induction of callus, roots, buds and plants.

1. INTRODUCCIÓN

Las zonas áridas y semiáridas son ecosistemas que ocupan aproximadamente una tercera parte de la superficie terrestre mundial. La mayor parte de la vegetación que ahí prospera corresponde a especies leñosas arbóreas y/o arbustivas, las cuales son determinantes en la vida de estos ecosistemas. Dentro de estas especies se encuentran las del género *Prosopis* (Mezquite). Sí bien este género es endémico de las zonas áridas y semiáridas de las Antillas, México y Centroamérica, actualmente está ampliamente distribuido en casi todo mundo (Pasiiecznik *et al.*, 2001).

En México las zonas áridas y semiáridas representan aproximadamente el 40% de la superficie del territorio nacional, en donde la asociación vegetal *Prosopis – Acacia*, cubre una superficie de 4'192,178 hectáreas en 17 estados (López *et al.*, 2006; Carrillo *et al.*, 2007), ahí prosperan nueve de las 44 especies del género. *Prosopis laevigata* se caracteriza por su amplia distribución en los estados del centro del país, entre los que se incluye Hidalgo, donde esta especie está ampliamente distribuida en los municipios de Actopan, Atotonilco el Grande, Cardonal (Ejido el Mezquital), Ixmiquilpan, Meztitlán, San Salvador, Santiago de Anaya y Tasquillo (INEGI, 2000). En estos municipios esta especie es de gran importancia económica para los pobladores principalmente en las zonas rurales, constituyendo una de sus principales fuentes de forraje, combustible y materiales de construcción. Recientemente ésta y otras especies del género han sido incluidas por la FAO dentro de la lista de árboles multipropósito para utilizarlas en programas de reforestación, ya que desempeñan un papel ecológico muy importante contra la desertificación de suelos erosionados, al mejorar su composición mediante la aportación de materia orgánica e incorporación de nitrógeno atmosférico a través de la asociación simbiótica con bacterias fijadoras de este elemento, del género *Rhizobium* (FAO/CIRF, 1980; Izquierdo y Palomino, 1996).

Prosopis laevigata presenta un rápido crecimiento, es resistente a la sequía y prospera en suelos áridos y poco fértiles. Sin embargo, la regeneración en su hábitat

natural es escasa debido a problemas de germinación de las semillas, ya que éstas poseen una cubierta dura e impermeable que impide el paso del agua. Debido a esto la germinación natural depende de fenómenos como la escarificación a través del tracto digestivo de los animales que consume sus semillas. Con la finalidad de romper la latencia e incrementar la germinación se han utilizado métodos de escarificación biológica (García *et al.*, 2000), mecánica (Torres *et al.*, 2000) y química (Martínez *et al.*, 2000). Con base en algunos estudios se ha logrado incrementar la germinación entre 70% y 80% (Martínez *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2000). La actividad forestal requiere una germinación rápida y uniforme ya que la latencia de las semillas continua siendo un problema de manejo en viveros forestales a gran escala. Con la finalidad de solventar este problema se han realizado diversos estudios para la propagación asexual mediante estacas (Arya *et al.*, 1994), acodos e injertos (Hudson y Dale, 1994), si bien ha sido posible el enraizamiento de estacas en varias especies del género, el porcentaje de plantas obtenidas ha sido muy bajo, por lo que es deseable explorar otras alternativas que permitan la propagación a gran escala de fenotipos de interés.

El cultivo de tejidos se ha utilizado como una alternativa para la propagación de algunas especies del género con potencial para usarse en el establecimiento de plantaciones y programas de reforestación (Ramawat y Nadwani, 1991); sin embargo, existe poca información sobre *P. laevigata* y sólo se ha logrado su regeneración a partir de cotiledones. Considerando que la capacidad de regeneración depende en gran parte del origen del explante, se requiere realizar investigación relacionada con el potencial del origen y edad del tejido, para identificar el explante más adecuado para la regeneración masiva y a corto plazo de la especie.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la edad del explante en la micropropagación de *Prosopis laevigata* a partir de yemas axilares.

2.2. Objetivo específico

Evaluar el efecto de reguladores de crecimiento sobre el proceso de diferenciación de explantes de *P. laevigata*.

3. ANTECEDENTES

3.1. Generalidades sobre el género *Prosopis*

3.1.1. Origen y distribución geográfica

El género *Prosopis* es uno de los más primitivos de la familia Leguminosae, subfamilia Mimosoidae, se piensa que se originó en África a fines de la Era Mesozoica e inicios del Periodo Terciario, donde se encuentra el representante menos especializado de este género (*P. africana*), además de tres especies que en su conjunto forman la sección *Prosopis*, las cuales habitan las zonas áridas desde el norte de África hasta la región del Cáucaso y la India (Burkart, 1940; Burkart, 1976; Rzedowski, 1988).

Actualmente el género se encuentra ampliamente distribuido en las zonas áridas y semiáridas del sur de Asia, así como en el norte y sur de América. Su extensa distribución en zonas áridas y semiáridas tropicales sugiere que el ancestro de las especies actuales pudo haber migrado, a nivel mundial, de este a oeste. A esto se atribuye el hecho de que en América el principal centro de diversificación del género se encuentra en Argentina, aunque un segundo centro se localiza en México. En América se conocen 40 especies, las cuales están distribuidas desde el norte de Estados Unidos de América hasta Chile y Argentina (Burkart, 1940; Burkart, 1976).

De las 40 especies conocidas nueve existen en México, distribuidas en 17 estados (Rzedowski, 1988), las mayores poblaciones se localizan en los estados del norte y centro del país: Baja California (*P. palmeri*), Tamaulipas (*P. reptans*), Baja California y Chihuahua (*P. pubescens* var. *cinerascens*), Baja California Sur y Sonora (*P. articulata*), desde Sinaloa hasta Chiapas (*P. juliflora*), Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas (*P. glandulosa* var. *glandulosa*), Baja California, Chihuahua, Sinaloa y San Luis Potosí (*P. glandulosa* var. *torrellana*), Tamaulipas, San Luis Potosí y Veracruz (*P. tamaulipana*), Sonora (*P. velutina*), y por todos los estados del centro, este y oeste, desde Sonora hasta Oaxaca (*P. laevigata*). Dentro de estos se incluye el estado de Hidalgo en donde está ampliamente distribuida en los municipios de Actopan, Atotonilco el Grande, Cardonal (principalmente en el ejido el Mezquital), Ixmiquilpan, Metztlán, San Salvador, Santiago de Anaya y Tasquillo (INEGI, 2000; Maldonado y De la Garza, 2000).

3.1.2. Clasificación taxonómica

En la clasificación del género *Prosopis* existen desacuerdos a nivel de especies, secciones y series, las dificultades para la adecuada clasificación se deben a la amplia variabilidad morfológica de las especies, producto de la hibridación e introgresión genética entre ellas, lo cual al generar fenotipos intermedios en las zonas de simpatría hacen más difícil su clasificación.

Las especies del género a través del tiempo han estado sujetas a diferentes sistemas de clasificación debido a la diversidad morfológica interespecífica e intraespecífica (Benson, 1941; Johnston, 1962). Bentham en 1875, incluyó la mayoría de las formas polimórficas del mezquite dentro de la sección *Algarobia* como una especie, situación que fue vigente hasta que Burkart (1940) las separó en diferentes especies.

En la actualidad el sistema de clasificación más aceptado es el propuesto por Burkart (1976), quien considera que las características morfológicas más importantes para la subdivisión seccional del género son la presencia de espinas en

los tallos y ramas de la planta, basándose en esto, dividió al género en cinco secciones:

La sección *Anonychium*, comprende una sola especie sin espinas, frutos largos y aplanados, pétalos glabros y ovarios pubescentes. La sección *Prosopis*, que incluye tres especies, las cuales tienen espinas en forma de púas a lo largo de los tallos, frutos redondos de color café, pétalos y ovarios glabros. La sección *Monilicarpa*, comprende una especie con espinas axilares individuales, fruto rojo brillante con glóbulos pronunciados, pétalos y ovarios pubescentes. La sección *Strombocarpa*, con nueve especies, las cuales presentan espinas en pares formadas de estipulas modificadas, frutos en forma espiral o cortos/redondos, pétalos y ovarios pubescentes. La sección *Algorabia*, constituida por 30 especies, presenta espinas terminales o axilares en pares o individuales, vainas con diferentes formas y ligeramente aplanadas, pétalos y ovarios pubescentes, en las especies de Norteamérica de esta sección se presentan las mayores confusiones morfológicas (Burkart, 1976; Burkart y Simpson, 1977).

Para México Burkart (1976) reconoce la existencia de tres especies de la sección *Strombocarpa* (*P. palmeri*, *P. reptans* y *P. pubescens*) y seis de la sección *Algorabia* (*P. articulata*, *P. tamaulipana*, *P. velutina*, *P. juliflora*, *P. laevigata* y *P. glandulosa* var. *torrellana*). Sin embargo, Johnston (1962) sólo reconoce para el territorio mexicano la existencia de cinco de las especies de la sección *Algorabia*. Si bien estos sistemas de clasificación son los más fundamentados, todavía están sujetos a cambios debido a los problemas que se tienen para definir correctamente al grupo a nivel de series.

Clasificación taxonómica de *Prosopis laevigata* (Burkart, 1976).

Phylum	Spermatophyta
Clase	Angiospermae
Subclase	Dicotyledoneae
Familia	Leguminosae
Subfamilia	Mimosoidae
Género	<i>Prosopis</i>
Sección	Algarobia
Serie	chilenses
Especie	<i>laevigata</i>

3.1.3. Descripción morfológica de *Prosopis laevigata*

Al igual que otras especies del género, en *Prosopis laevigata* los individuos pueden encontrarse en forma arbórea o arbustiva de 2 a 3 m de altura, llegando a crecer hasta 6 ó 7 m, sus troncos tienden a ser rectos, aunque es común encontrar árboles torcidos (Figura 1). Las ramas son glabras y presentan espinas axilares. Las hojas son bipinadas de 2.5 a 12 cm de largo, con 20 a 30 pares de folíolos cada una. Los folíolos son glabros, lineares, oblongos de 5 a 10 mm de largo, y de 2 a 7 veces más largos que anchos. Su color es verde pálido a grisáceo, y en la parte inferior tiene una fuerte nervadura pinada (Ffolliott y Thames, 1983).



Figura 1. *Prosopis laevigata* en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztlán, Hgo.

Las Inflorescencias de la especie son racimos de 4 a 10 cm de largo, cada inflorescencia puede tener de 25 a 300 flores dependiendo de su tamaño. Las flores son blanco-verdosas con cinco pétalos de 3 a 4 mm de largo. El cáliz es de alrededor de 1 mm de largo, acampanado y brevemente dentado con cinco sépalos unidos muy cerca de la base. Presenta diez estambres libres brevemente salientes, anteras con una glándula pequeña y decidua en el ápice; ovario sésil o estipitado, multiovulado, estilo filiforme, estigma pequeño y terminal (Rzedowski, 1988).

Los frutos son vainas de 9 a 17 cm de largo y 0.7 a 1.4 cm de ancho, son lineares, glabros, derechos o levemente curvados y de un color amarillo puro. Los segmentos son redondeados o rectangulares en su corte transversal y son más cortos que anchos. Las semillas se encuentran dispuestas en forma longitudinal dentro de la vaina (Rzedowski, 1988).

3. 2. Función ecológica del mezquite

Los mezquites son considerados plantas termo-xerófitas debido a su gran resistencia a la sequía y a las altas temperaturas, son especies que comúnmente se desarrollan en climas secos, sus características morfológicas y fisiológicas les han permitido prosperar en diferentes ambientes ecológicos de regiones tropicales y subtropicales (Simpson y Solbrig, 1977). En nuestro país se desarrollan tanto a nivel del mar como a altitudes mayores de 2,000 msnm, a un rango de precipitación anual de 50 a 600 mm, y temperaturas medias anuales de 15 hasta 45°C (Rzedowski, 1988).

En el ámbito ecológico *Prosopis* juega un papel muy importante en la composición y dinámica de desarrollo de la vegetación y la fauna (Pandit, 1996). En las regiones áridas y semiáridas donde comúnmente se localiza, su dosel actúa como un nicho de colonización que permite el establecimiento y desarrollo de especies epífitas herbáceas y leñosas, que al formar grandes conglomerados contribuyen a la formación del bosque espinoso. A la fauna le proporcionan refugio y sustento, un gran número de insectos se alimentan del polen y el néctar de sus flores, las cuales también utilizan como sitios de apareamiento; sus frutos constituyen una fuente de alimento para algunos vertebrados como roedores y animales de pastoreo (Ramírez *et al.*, 1997). Además, como todas las leguminosas mejora la fertilidad y estructura de los suelos mediante la acumulación de materia orgánica (Garg, 1998) y la incorporación de nitrógeno atmosférico al suelo, como resultado de la interacción de bacterias fijadoras de nitrógeno con las raíces de los mezquites (Aiazzi *et al.*, 1996; Ovalle *et al.*, 1996).

3. 3. Usos potenciales del mezquite

El uso del mezquite se remonta a la época prehispánica, evidencias arqueológicas han mostrado que varias especies de *Prosopis* fueron utilizadas por los antiguos pobladores del continente Americano como fuente de alimento, medicina, combustible y para la construcción de viviendas (Felger, 1977). En la actualidad el mezquite es utilizado como combustible, ya sea en forma de leña y

como carbón, y como madera aserrada. La madera de mezquite es difícil de labrar, esto hace que los muebles sean muy apreciados y de gran durabilidad comparados con otras especies, el tipo de muebles que más se trabaja con esta madera es del tipo colonial mexicano, por ser el más artístico, aunque el provenzal también es trabajado, pero en menor escala (Pasiiecznik *et al.*, 2001).

3.4. Tipos de reproducción

3.4.1. Reproducción sexual

El mezquite es una especie leguminosa que en condiciones naturales únicamente se reproduce por semilla (reproducción sexual). Se designa bajo el nombre de semilla al órgano proveniente de la transformación del óvulo tras la fecundación. La semilla es el estadio más vulnerable en el ciclo de vida del mezquite, debido a la limitada cantidad de agua presente en el ambiente desértico donde prospera y a la gran cantidad de plagas que la atacan. La dispersión de la semilla es endozooica, a través de tracto digestivo de roedores y caprinos, lo cual tiene una doble función ya que la semilla es alejada del árbol progenitor y los agentes que pudiesen afectar la germinación son eliminados por los fluidos digestivos; además, proporciona un benéfico proceso de escarificación que hace que la germinación se lleve a cabo en menor tiempo, rompiendo el letargo de la semilla (CONAZA – INE, 1994).

El letargo en la semilla de mezquite constituye un mecanismo de control en la germinación, lo cual es de gran importancia en la naturaleza ya que contribuye a la supervivencia y a la dispersión natural de las plantas, sobretodo en aquellas que se desarrollan en regiones desérticas o frías, donde las condiciones ambientales no son adecuadas para la inmediata germinación. Sin embargo, el mezquite presenta problemas respecto a la germinación de sus semillas en condiciones naturales ya que poseen una cubierta demasiado dura e impermeable que impide el paso del agua, inhibiendo en parte este proceso, lo cual merma la regeneración en su hábitat natural. La dura cubierta de sus semillas también representa un problema para su manejo en la producción de planta en vivero, ya que manejar semillas con cierto

grado de latencia impide al viverista obtener una rápida y uniforme germinación, lo cual es indispensable para la obtención de planta de calidad en cuanto a sus características morfológicas (McDonough, 1977).

Con la finalidad de romper la latencia e incrementar la germinación se han utilizado métodos de escarificación biológica (García *et al.*, 2000), mecánica (Torres *et al.*, 2000) y química (Martínez *et al.*, 2000). Con base en algunos estudios se ha logrado incrementar la germinación entre 70 y 80% (Martínez *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2000). Sin embargo, la actividad forestal requiere una germinación rápida y uniforme de árboles superiores, razón por la cual se ha puesto especial atención en estudios sobre la latencia y la variabilidad intra e interespecífica para lograr resultados óptimos en la reproducción de la especie.

3.4.2. Reproducción asexual

La reproducción asexual también es conocida como propagación vegetativa, agamética o clonal. Este tipo de reproducción se refiere a la generación de un nuevo individuo a partir de células, tejidos u órganos de la planta original, sin que se presente el proceso de fecundación, producto de la fusión de las células sexuales (Gutiérrez e Ipinza, 1998).

La propagación vegetativa se basa en la característica de totipotencia de las células y se presenta en forma natural en organismos inferiores y plantas. La totipotencia se refiere a la propiedad de las células vegetativas de contener la información genética necesaria para regenerar un organismo completo (Harmant *et al.*, 1997). Este tipo de reproducción se puede llevar a cabo mediante las técnicas de macro y micropropagación.

3. 5. Macropropagación

La multiplicación clonal mediante macropropagación involucra el uso de métodos convencionales entre los que destacan los injertos, acodos y el enraizado de estacas, en especies forestales estas técnicas se han utilizado en casos en los

que es difícil la propagación por semilla, así como para preservar y multiplicar genotipos con características deseables, estudios genéticos, acortamiento del ciclo reproductivo para acelerar procesos de cruzamiento, y para el establecimiento de plantaciones comerciales con la finalidad de obtener una producción homogénea y un alto rendimiento (Gutiérrez e Ipinza, 1998).

Mediante estas técnicas se ha logrado la propagación de diferentes especies de angiospermas y gimnospermas entre las que destacan los géneros *Cryptomaria* (Zobel y Talbert, 1992), *Pinus* (Prehn *et al.*, 2003), *Populus* (Thakur *et al.*, 2005), *Salix* y *Eucalyptus* (Gutiérrez *et al.*, 1994; Bisht *et al.*, 2003).

En el caso particular del género *Prosopis*, con la idea de solventar el problema de la latencia de la semilla en la producción de planta, se han realizado diversos trabajos encaminados a su propagación vegetativa en las que se han utilizado las técnicas de acodos en *P. cineraria* (Solanki *et al.*, 1984), injertos (Ewens y Felker, 2003) y estacas (Wojtusik *et al.*, 1994; Pasiiecznik *et al.*, 2001). Esta última técnica ha sido la más utilizada y ha logrado el enraizamiento de estacas, en algunas de las especies del género, con rangos de respuesta muy variados. Felker y Clark (1981) obtuvieron el 80% de enraizamiento en *P. alba*, *P. articulata*, *P. chilensis*, *P. glandulosa*, *P. pallida* y *P. velutina*, mientras que otros autores han reportado para *P. alba* 84% y 50% en *P. chilensis* y *P. pallida*. En *P. juliflora* se han reportado los rangos más variable de entre 30% al 90 % (Wojtusik *et al.*, 1994).

La variación en la respuesta de enraizamiento de las estacas se ha atribuido principalmente al genotipo y a diferencias del estado fenológico de las estacas, ya que se sabe que éstas van perdiendo su capacidad para enraizar a medida que el tejido es más viejo, debido a que en las ramas adultas se incrementa la cantidad de tejido esclerenquimático y la acumulación de compuestos fenólicos que interfieren en la formación de raíces (Arya *et al.*, 1994; Balboa *et al.*, 1987). Entre otros factores destaca la pérdida de humedad relativa causada por el incremento de temperatura en las cámaras de enraizamiento o en el invernadero, lo cual provoca la deshidratación del tejido, afectando la producción de raíces (Klass *et al.*, 1985). Por

otra parte, la contaminación endógena del material vegetativo limita la respuesta del material juvenil y adulto, ya que muchas veces no responde ni al tratamiento con fungicidas ni a los bacteriostáticos (Balboa *et al.*, 1987).

3. 6. Micropropagación

La micropropagación involucra el uso de técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Este tipo de cultivo se define como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo de órganos, tejidos, células y protoplastos, empleando medios nutritivos artificiales, en condiciones asépticas.

Esta técnica remonta sus orígenes a 1902; en la década de los 40's del siglo pasado se hicieron importantes aportaciones en la propagación de especies hortícolas y agrícolas. Sin embargo, en especies forestales los primeros estudios se iniciaron en 1960, y en la década de los 70's se presentaron los primeros trabajos relacionados a la regeneración *in vitro* de diferentes gimnospermas (Navarro y Vera, 1988; Villalobos *et al.*, 1983; Magallanes, 1997).

Esta forma de cultivo proporciona una ventaja económica importante a la industria forestal (Attree y Fowke, 1993; Gupta *et al.*, 1993), ya que también se pueden reducir los largos períodos de maduración en algunas especies. Es también una alternativa para resolver el problema de la baja viabilidad de las semillas en algunas especies. En general permite superar la dificultad que presentan algunos individuos para propagarse por métodos tradicionales (Trigiano *et al.*, 1992).

La micropropagación tanto en especies herbáceas y leñosas se puede llevar a cabo mediante los procesos morfogenéticos de organogénesis o embriogénesis somática. La morfogénesis se define como el origen de los cambios en la forma específica (estructura y organización) durante el desarrollo de un organismo, esto puede ocurrir vía organogénesis o embriogénesis somática y ella depende tanto de la naturaleza del explante como del genotipo (Endress, 1994).

3.6.1. Organogénesis

La organogénesis consiste en la formación de nuevos órganos (raíces y/o brotes adventicios) a partir de explantes (segmentos de hojas, tallo, raíz y yemas) cultivados *in vitro*. Este proceso se caracteriza por presentar un desarrollo unipolar, es decir, en la formación de un primordio unipolar a partir de una yema o cualquier otro tejido de la planta, con el subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo. La formación de plantas mediante esta vía morfogenética se da en cuatro etapas: 1) iniciación de yemas, 2) desarrollo de la yema a brote, 3) enraizamiento de brotes, 4) trasplante a suelo (Jiménez, 1998).

En este proceso los tejidos juveniles frecuentemente presentan una mejor respuesta que los tejidos que provienen de órganos adultos o senescentes. Esta aptitud está ampliamente aprovechada en la multiplicación vegetativa *in vitro*, sobre todo en los casos de especies leñosas difíciles de propagar. En muchas especies los cotiledones expandidos de plántulas producen más brotes adventicios que todo el embrión, hipocotilo o cualquier otro tejido de la plántula, convirtiéndolos en el mejor explante (George, 1993).

La vía de organogénesis se ha utilizado con mayor frecuencia y es con la que se ha obtenido mayor éxito para la propagación *in vitro* de especies leñosas, tal es el caso de los géneros: *Acacia*, *Celtis*, *Erythrina* (Abedini, *et al.*, 2000), *Eucalyptus* (Joshi *et al.*, 2003) y *Pinus* (Aitken *et al.*, 1981).

3.6.2. Embrionogénesis

La embriogénesis somática es el proceso por el cual se obtiene una estructura similar al embrión zigótico, conocida como embrión somático, asexual o adventicio, la cual se inicia a partir de células que no son producto de la fusión de gametos. Los embriones somáticos son estructuras bipolares que tienen un eje apical-radical, aislado por un tejido epidérmico, y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares deben ser capaces de crecer y formar plantas completas (Tisserat *et al.*, 1979).

La formación del embrión somático se puede dar mediante un proceso de embriogénesis directa o indirecta. La embriogénesis directa se da sin la formación de callo (crecimiento celular desordenado) a partir de células preembriogénicas, es decir de embriones zigóticos. Mientras que la embriogénesis indirecta se da vía formación de callo, estas células son capaces de adquirir competencia embriogénica y dar origen a un embrión somático, a partir del cual se genera la nueva planta. La formación de embriones somáticos por ambos procesos de embriogénesis, involucran las siguientes fases: inducción, iniciación, proliferación del cultivo embriogénico, maduración de embriones somáticos, germinación y obtención de plantas (Rodríguez *et al.*, 2005).

La regeneración mediante el proceso de embriogénesis se ha logrado en un gran número de especies leñosas; sin embargo, éste es muy inferior al de las especies herbáceas. En la mayoría de los casos se han utilizado tejidos embrionarios o juveniles y sólo en especies como *Carica papaya* y *Aesculus hippocastnum* se han utilizado tejidos adultos. La embriogénesis con material adulto se ve limitada por la necesidad de utilizar tejidos en crecimiento activo, así como por la producción de compuestos fenólicos, y por los largos periodos de subcultivo requeridos para obtener una respuesta (Rodríguez *et al.*, 2005). A la acción de todos estos factores se atribuye que las especies leñosas, sobre todo durante la fase adulta, sean recalcitrantes a la embriogénesis. Si bien esta característica es responsable de la baja tasa de regeneración de las especies leñosas mediante la vía embriogénica, la ventaja de esta tecnología, aplicada a la propagación de especies leñosas, es que constituye un método alternativo de micropropagación, por otra parte la encapsulación de los embriones en semillas artificiales puede facilitar los programas de reforestación (Sánchez *et al.*, 2005 b).

3.7. Factores que afectan el proceso morfogénico

Los cuatro factores principales que condicionan la obtención y el crecimiento de nuevos órganos en condiciones *in vitro* son el genotipo, el tipo de explante, y las condiciones químicas y físicas seleccionadas para el medio de cultivo. El genotipo es

un factor determinante en todos los procesos morfogenéticos, su influencia radica desde la capacidad del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro*, así como en la proliferación de callo o la diferenciación y crecimiento de nuevos órganos.

Al efecto del genotipo se suman las condiciones físicas y fisiológicas en las que se encuentre el explante, así como la parte de la planta que se usara como explante, ya que estos a su vez determinarán la respuesta morfogénica *in vitro*. Por estas razones no es posible generalizar metodologías o protocolos de trabajo debido a que los medios de cultivo, así como las condiciones de cultivo seleccionados, deben ser particulares de cada especie (Pierik, 1987; Bruce y John, 1988).

En cuanto a los medios de cultivo, se han utilizado con éxito diferentes formulaciones químicas entre las que destacan las de los medios MS (Murashigue y Skoog, 1962), las del SH (Shenk y Hildebrandt, 1972) y DCR (Gupta y Durzan, 1985). Dentro de la diversidad de condiciones de cultivo y factores utilizados para inducir respuesta morfogenética destacan como factor de inducción las fuentes orgánicas e inorgánicas de nitrógeno, así como la concentración de reguladores de crecimiento, ya que las combinaciones de auxinas y citocininas son determinantes para la inducción y manifestación del proceso embriogénico en etapas específicas del proceso organogénico. El resto de los factores físicos y químicos del medio, como la fuente de energía, pH, estado físico del medio (sólido, semisólido, líquido) e intercambio gaseoso, han sido menos estudiados, probablemente por que se considera que estos no suelen condicionar el éxito de la respuesta como la fuente de nitrógeno y el fotoperiodo (Ammirato, 1983).

Regularmente para la iniciación de yemas se han utilizado medios de cultivo con altas concentraciones de elementos nutritivos y citocininas, y bajas concentraciones de auxinas. Se ha observado claramente un incremento en la respuesta de los explantes, para la iniciación de brotes o yemas, cuando se usan bajas concentraciones de ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) y ácido indolacético (AIA) (Bonga, 1981; Gupta y Durzan, 1985), lo cual demuestra

que los reguladores de crecimiento son los factores determinantes para los procesos de organogénesis y embriogénesis. Así mismo se ha observado que una buena proporción de brotes son inducidos cuando los explantes son cultivados en medios suplementados fundamentalmente con citocininas, mientras que las raíces se desarrollan en medios adicionados con auxinas.

Las citocininas estimulan un cambio en el patrón de diferenciación ya que modifican el plano de división celular, lo cual provoca la multiplicación o división de células en los tejidos del explante (Bidwell, 1979).

Para la proliferación de brotes en angiospermas y gimnospermas se ha determinado que es necesaria la incorporación de citocininas, las más utilizadas han sido la bencil adenina (BA), cinetina (KI) y N6-isopentiladenina (2-ip). Sin embargo, en algunas especies la adición de BA en forma individual o combinada con otras citocininas, afecta la capacidad de formación de las yemas, también se ha observado que la exposición prolongada a citocininas puede suprimir el crecimiento y el desarrollo de brotes (Ammirato, 1986; Hartmann *et al.*, 1997).

Si bien la concentración de auxinas y citoquininas en los medios de cultivo permite la regeneración de un gran número de especies leñosas, existen muchos casos en los que no ha sido posible inducir respuestas, lo cual sugiere que es necesario realizar más estudios enfocados a los diferentes factores que influyen en el proceso morfogénico, ya que cada especie tiene diferentes requerimientos y grado de respuesta a los diferentes factores (Pierik, 1987; Segura, 2000).

3.8. Propagación *in vitro* de *Prosopis*.

El cultivo *in vitro* se ha utilizado como una alternativa para la propagación masiva de algunas de las especies del género con potencial para la reforestación en zonas áridas. Mediante esta tecnología se ha logrado la regeneración en por lo menos diez de las especies del género que prosperan en Argentina y África, mientras que son contados los trabajos realizados en las especies desarrolladas en México (Jordan, 1996). En los trabajos de micropropagación de estas especies se han utilizado diferentes medios de cultivo, fuentes de explante de varios tamaños y

plantas en diferente estado fisiológico, por lo que los resultados han sido muy variados y difíciles de reproducir, ya que muchos de los factores que afectan la macropropagación también tienen gran influencia en la propagación *in vitro* (Batchelor, 1990).

Walton *et al.*, (1990) lograron la regeneración de plantas a partir de ápices de tallos en *P. glandulosa* (100 %), *P. alba* (94%), *P. juliflora* (74%), *P. chilencis* (67%), *P. cinaria* (9%) y *P. tamarugo* (4%). Ramawat y Nandwani (1991) encontraron que es más fácil la regeneración de raíces en los ápices de *P. juliflora* y *P. tamarugo* en relación con *P. cinaria*.

En la regeneración de plantas a partir de explantes nodales también se han reportado diferencias en la respuesta, Batchelor *et al.*, (1989) obtuvieron regeneración de *P. chilencis*, *P. cinaria* y *P. juliflora* en un 75% de los explantes, mientras que Jordan *et al.*, (1987) observaron regeneración del 50% en *P. chilencis* y de 14% en *P. tamarugo*, por lo cual determinó que la respuesta de enraizamiento fue mejor y más rápida en la primera.

En los estudios de micropropagación de *Prosopis* también se ha demostrado que la edad del explante tiene gran influencia en la respuesta de regeneración de brotes. En ápices de tallos de *P. chilencis* de 4 a 20 semanas de edad se observó que a medida que incrementa la edad, se inhibe la inducción de raíces (Walton, 1990). Sin embargo, Arce y Balboa (1990), con la misma especie y utilizando ápices de la misma edad, no detectaron diferencias en la producción de raíces, en todos los casos el 60% de los ápices desarrollaron raíces. No obstante que se conoce que el potencial de regeneración disminuye drásticamente en tejidos de plantas adultas, hay reportes de regeneración en explantes de plantas de *P. juliflora* de diez años de edad.

En la micropropagación del *Prosopis* se han usado diferentes medios de cultivo, generalmente en todos se incorporan altas concentraciones de auxinas para estimular el enraizamiento y bajas concentraciones de citocininas para la inducción de brotes. Si bien la cinetina es la que se utiliza con más frecuencia, se han

regenerado plantas a partir de ápices de seis especies de *Prosopis* en medios con AIB (Walton *et al.*, 1990). Ramawat y Nadwani (1991) estimularon la regeneración de raíces en ápices de *P. juliflora* en medio suplementado con ANA ó AIB, también observaron que el enraizamiento se incrementa al aumentarse las concentraciones de hormonas. Sin embargo, se ha encontrado que el AIB y la cinetina son efectivos para la elongación de tallos y el desarrollo de plantas a partir de nudos de *P. chilensis*, mientras que el desarrollo de plantas a partir de ápices se estimuló con AIB y benzilaminopurina (Batchelor, 1990).

Si bien, se ha logrado la propagación *in vitro* de algunas especies del género, aún no se ha logrado la producción masiva, debido que la mayoría de las especies propagadas, hasta el momento han mostrado ser recalcitrantes en el cultivo *in vitro*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del experimento

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Forestal del Área Académica de Ingeniería Forestal, perteneciente al Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, en Tulancingo, Hidalgo.

4.2. Material Biológico

Se utilizaron vainas de *Prosopis laevigata* colectadas en la Reserva de la Biosfera “Barranca de Metztitlán”, la cual abarca una superficie de 96,042.94 ha y se extienden a lo largo de seis Municipios del Estado de Hidalgo: Metepec, Acatlán, Huasca de Ocampo, Atotonilco el Grande, San Agustín Metzquititlán y Metztititlán. El germoplasma (semillas) se colectó en la localidad Carrizal Chico situada en el Municipio de San Agustín Metzquititlán, la cual cuenta con una superficie de 811.54 ha y se localiza en la parte central de la reserva, en el centro-este del estado de Hidalgo, en las inmediaciones de las coordenadas 20° 14' 15" y 20° 45' 26" de latitud norte y 98° 23' 00" y 98° 57' 08" longitud oeste. La “Barranca de Metztitlán” presenta altitudes que van de los 1,000 a los 1,200 msnm en su parte mas baja al norte, hasta los 2,000 a 2,200 msnm en su parte más alta. Con presencia de climas cálidos húmedos (A) en su vertiente del Golfo, climas templados subhúmedos (C) en las partes altas, y climas áridos (B) en sus vertientes occidentales. Con precipitaciones estacionales de 2.2 mm en invierno y de hasta 127.7 mm en verano. La temporada más caliente del año es primavera, antes del solsticio de verano, particularmente en el mes de mayo, con temperaturas máximas de hasta 34.2 °C y las más frías se presentan de diciembre a enero, con temperaturas mínimas de 4.6 °C (CONANP, 2003).

4.3. Limpieza y escarificación de la semilla

La limpieza del material biológico se realizó utilizando pinzas de punta para separar las semillas removiendo la testa y la pulpa, con la ayuda de unas tijeras de poda se eliminó el mesocarpio, se le hizo un corte en cada extremo de la vaina dejando únicamente el endocarpio con el embrión. Posteriormente para la escarificación se colocaron lotes de 200 semillas en frascos de vidrio de 120 mL de capacidad, a los que se les agregaron 50 mL de ácido sulfúrico concentrado con la ayuda de una pipeta y una perilla. El ácido se dejó reaccionar durante cinco minutos, después se decantó el ácido sulfúrico con una espátula en un vaso de precipitado que contenía agua destilada, lavándose cinco veces las semillas con agua de la llave para quitar los remanentes del ácido.

4.4. Siembra

Los lotes de semillas escarificadas se sembraron independientemente durante los meses de enero, abril y noviembre del 2007. Las semillas se sembraron aproximadamente a 1 cm de profundidad en tubetes de plástico de 1.5 pulgadas de diámetro por 7.5 de profundidad, conteniendo una mezcla de 70% de tierra de monte molida (hojas, cortezas, ramas de encino y pino) y 30% de agrolita, la cual se humedeció previamente al llenado de los tubetes. Las plantas desarrolladas se mantuvieron en estas condiciones durante un periodo de cuatro a cinco meses.

4.5. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el MS (Murashige y Skoog, 1962). En los apéndices A, B y C se describe la composición y preparación de las soluciones respectivas. Este medio también fue suplementado con diferentes concentraciones de auxinas y citocininas, entre las que se encuentran el ácido naftalen acético (ANA), cinetina (Kn), ácido indol acético (AIA), ácido indol butírico (AIB), 6 bencil amino purina (BAP) y ácido giberelico (GA₃) (Cuadro 1).

4.5.1. Preparación del medio de cultivo

El medio se preparó a partir de soluciones concentradas (Apéndices A y B); en un vaso de precipitado de 1,000 mL se adicionó un volumen de agua destilada equivalente al 50% del total del medio que se deseó preparar, se añadieron las cantidades necesarias de cada una de las soluciones inorgánicas concentradas (Apéndice C), se agregaron los reguladores del crecimiento con ayuda de una pipeta. El pH del medio se midió con un potenciómetro (Corning ®), ajustándose a 5.8 con NaOH 1M ó HCl 1M, se aforó el volumen final con agua destilada y se agregaron 0.05 g de agar por cada 100 ml de solución. El medio se licuó con la ayuda de una parrilla eléctrica (Corning ®) con agitación, lográndose esto cuando la solución alcanzó la temperatura de ebullición (80 – 90 °C) y se tornó transparente. Con ayuda de una probeta se colocaron 20 mL de medio en frascos de vidrio de 120 mL de capacidad, los frascos se cerraron herméticamente con hule cristal. Los frascos con el medio de cultivo se esterilizaron en una autoclave (Isolab, Laborgerate GMBH ®) a una presión 150 Lb/pulgada², durante 15 minutos.

Cuadro 1. Medio de cultivo MS suplementado con diferentes concentraciones de auxinas, citocininas y giberelinas.

Medio de cultivo	Reguladores del crecimiento (mg/L)					
	ANA	Kn	AIA	AIB	BAP	GA ₃
MS 1	—	—	—	—	—	—
MS 2	1.0	—	—	—	—	—
MS 3	1.0	0.01	—	—	—	—
MS 4	—	—	—	—	1.0	0.04
MS 5	0.5	—	—	—	1.0	—
MS 6	1.0	—	—	—	1.0	—
MS 7	—	—	—	1.0	—	—
MS 8	1.0	—	—	1.0	—	—
MS 9	—	—	—	3.0	—	—
MS 10	—	—	—	0.5	—	—
MS 11	0.1	1.0	—	—	—	—
MS 12	0.1	—	—	1.0	—	—
MS 13	—	1.0	1.0	—	—	—
MS 14	0.25	4.5	—	—	—	—
MS 15	—	—	3.0	—	—	—
MS 16	—	—	1.0	—	1.0	—

4.6. Selección y desinfección del material biológico

El establecimiento del cultivo *in vitro* se realizó a partir de explantes de yemas provenientes de tallos de las plantas desarrolladas en invernadero, se cortaron segmentos de 0.5 cm de los tres últimos entrenudos de cada tallo de plantas de cuatro, seis, nueve y 14 meses de edad, con una tijera de poda. El material vegetal se colocó en frascos de vidrio de 0.5 L de capacidad y se enjuagó cuatro veces con agua corriente, para eliminar restos de polvo. Las muestras se desinfectaron superficialmente adicionando una solución de alcohol al 70% permaneciendo en ésta durante dos minutos, al concluir este periodo se retiró el alcohol y se agregó una solución de Cloralex® al 50% V/V en la que permanecieron por 30 minutos. Posteriormente, bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar (ESCO), se retiró la solución de Cloralex® y se enjuagaron cinco veces con agua esterilizada.

4.7. Establecimiento del cultivo *in vitro*

La siembra se realizó en condiciones asépticas, el material biológico se manipuló en una campana de flujo laminar frente a lámparas de alcohol y en cajas petri estériles. Todo el instrumental que estuvo en contacto con el material biológico fue previamente esterilizado. Los fragmentos de tallo fueron colocados en una caja petri seccionándose la yema apical y las tres yemas axilares. Posteriormente, con una pinza de disección flameada se tomaron las yemas y se sembraron en los diferentes tratamientos del medio de cultivo, manteniendo la polaridad del tejido. Se sembraron cinco explantes por frasco con cinco repeticiones por tipo de formulación del medio. Finalmente los cultivos se incubaron a un fotoperiodo de 16 h luz y ocho de oscuridad, a $26 \pm 2^{\circ}$ C en una cámara de incubación de tipo columnar (PRECISION), por un periodo de 20 días, al finalizar éste las yemas se transplantaron a medio fresco, durante dos periodos de 20 días cada uno.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presenta la evaluación del efecto de la edad del explante y de los reguladores de crecimiento en el proceso morfogénico de *Prosopis laevigata*, utilizando yemas axilares de plantas de cuatro, seis, nueve y 14 meses de edad; así como diferentes concentraciones de auxinas y citocininas en forma individual y en diferentes combinaciones en el medio de cultivo. Las respuestas morfogénicas evaluadas fueron la inducción de callo y el desarrollo de brotes, raíces y plantas completas.

5.1. Inducción de callos

Al evaluar esta respuesta se observó formación de callo en los explantes correspondientes a cuatro edades diferentes, tanto en ausencia como en presencia de reguladores de crecimiento. La mejor respuesta se obtuvo en presencia de auxinas en el medio MS 9 (AIB 3.0 mg/L) y MS 15 (AIA 3.0 mg/L) en donde el 100% y 89.4%, respectivamente, de las yemas de plantas de nueve meses de edad formaron callo (Cuadro 2), mientras que en los explantes de cuatro meses la mejor respuesta se obtuvo con la combinación de auxinas y citocininas del medio MS 16 (AIA/BAP 1.0/1.0 mg/L), la cual indujo la formación de callo en el 84.6% de las yemas (Cuadro 2). En el resto de los tratamientos la respuesta fue menor y muy variable.

En todos los casos los callos presentaron una coloración blanca y consistencia dura (Figura 2), su formación se inició en áreas aisladas, en la base del explante, a los ocho días después del primer período de incubación. Si bien el crecimiento inicial se presentó en estas áreas a los 60 días de incubación se observó que la masa celular cubrió la mayor parte del explante y adquirió una tonalidad café, causada por un proceso de oxidación celular (Figura 2), lo cual ocasionó la muerte de las células durante el segundo período de incubación.

Los resultados del presente trabajo muestran que para *P. laevigata* la edad del explante es un factor determinante para la inducción de callos, y que los tejidos jóvenes tienen mayor potencial, ya que tanto en ausencia como en presencia de las diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento probadas, se observó mayor proliferación celular en los explantes de cuatro meses de edad. La inducción de callos en ausencia de reguladores indica que en esta especie las auxinas y citocininas están en una concentración idónea, lo que permite inducir la división celular del parénquima en los explantes de las cuatro edades, y que la formación de callo no es dependiente de la incorporación de reguladores exógenos al medio de cultivo. Sin embargo, para obtener una abundante masa celular en explantes de esta especie es fundamental la adición de auxinas y/o citocininas.

La presente investigación también muestra que la especie presenta una mejor respuesta en presencia de auxinas (AIA 3 mg/L y AIB 3 mg/L), así como con la combinación auxina-citosina (AIA 1 mg/L/BAP 1mg/L). Los resultados contrastan con los obtenidos en otras especies del género, en donde las mejores respuestas se han obtenido con otras auxinas y diferentes combinaciones de auxinas, citocininas y giberelinas. Jordan (1987) indicó que en explantes de nueve meses de *P. chilensis* y *P. tamarugo* la formación de callo se indujo en el 100 % y 85.7 % de los explantes, respectivamente, con una combinación de auxinas y citocininas (ANA 3.0 mg/L / K 1.0 mg/L) y en otra de auxinas, citocininas y giberelinas (ANA 3.0 mg/L+ K 0.01 mg/L + GA₃ 0.01 mg/L).

Otro estudio encontró que tomando explantes de yemas de plantas de uno a cuatro meses de edad, en plantas de *P. chilensis*, sólo el 8% de los explantes desarrollaron callo en presencia de 5.0 mg/L de ANA (Balboa *et al.*, 1987). En la presente investigación con esta auxina, a una concentración de 1mg/L, se indujo la formación de callo en el 47.3% de los explantes de cuatro meses de edad.

Batchelor *et al.*, (1989) al utilizar 81 combinaciones de reguladores de crecimiento en rangos de 0.05-15 mg/L, entre los que se incluyen los utilizados en el presente trabajo, encontraron que en todas las combinaciones se indujo la formación de callo en explantes de tres a 12 meses de edad, de plantas de *P. cineraria* y *P. tamarugo*, mientras que en *P. juliflora* no se observó dicha respuesta.

La presente investigación indica que la gran variabilidad detectada en la respuesta de inducción de callos depende en gran medida del genotipo, así como del estado fisiológico de la planta y de la interacción entre el contenido hormonal endógeno del explante, y la incorporación exógena de reguladores de crecimiento. La apariencia y formación de callo en la base de los explantes utilizados en el presente estudio, también se ha observado en explantes de diferente origen en *P. chilensis*, *P. tamarugo* y *P. Juliflora*, (Jordan, 1987; Balboa *et al.*, 1987; Buendía *et al.*, 2007). La formación de callos de éstas y otras especies se ha atribuido a la acumulación de auxinas en los extremos del corte basal, lo cual estimula la proliferación celular que se incrementa en presencia de citocininas (Marks y Simpson, 1994).

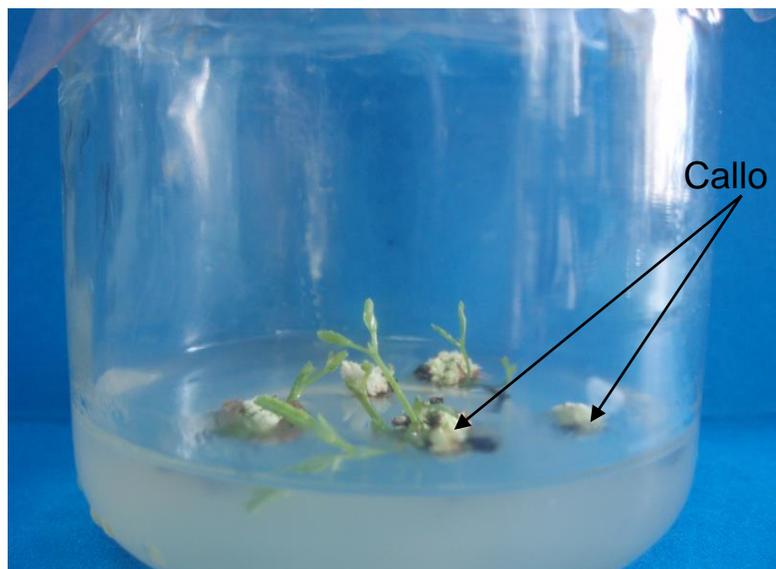


Figura 2. Aspecto de los callos desarrollados en explantes de plantas de *P. laevigata* de cuatro meses de edad, en el medios MS 16 (1mg/L AIB, 1 mg/L BAP) a los 30 días de incubación.

La pigmentación café desarrollada en los callos de *P. laevigata*, en la presente investigación, y en otras especies del género, se ha atribuido a la producción de compuestos fenólicos y ésta se ha asociado a un mecanismo de defensa contra el daño físico (heridas) causado en el follaje por los herbívoros (Pisani y Distel, 1998; Pisani y Distel, 1999; Orozco *et al.*, 2000). La necrosis de los callos observada en el presente estudio sugiere que esta especie sintetiza una gran cantidad de compuestos fenólicos y éste se presentó, no obstante la adición de los antioxidantes ácido ascórbico y cisteína al medio de cultivo. Como alternativa para controlar la oxidación del tejido se podría incrementar la concentración de los antioxidantes o bien, utilizar carbón activado con el que se ha controlado la oxidación en otras especies (Ramawat y Nandwani,1991).

Cuadro 2. Inducción de callo a partir de yemas axilares de *P. laevigata* provenientes de plantas de cuatro, seis, nueve y 14 meses de edad, cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes con 20 repeticiones por tratamiento.

Medio MS	Reguladores (mg/L)	No. de Explantes	Inducción de Callo (%)			
			Meses			
			4	6	9	14
1	Testigo	60	31.2	13.6	11.1	30
2	ANA (1.0)	60	47.3	34.7	13.3	27.7
3	ANA/Kn (1.0/0.01)	60	60.8	47.3	45.4	69.2
4	BAP/GA3 (1.0/0.04)	60	37.5	52	31.2	20
5	ANA/BAP (0.5/1.0)	60	69.2	62.5	41.1	57.1
6	ANA/BAP (1.0/1.0)	60	63.6	30.4	60	64.2
7	AIB (1.0)	60	41.6	56.2	45.4	30.7
8	ANA/AIB (1.0/1.0)	60	66.6	20.8	33.3	54.5
9	AIB (3.0)	60	81.8	36.3	100	70
10	AIB (0.5)	60	50	43.4	25	66.6
11	ANA/Kn (0.1/1.0)	60	57.8	20	71.3	69.2
12	ANA/AIB (0.1/1.0)	60	71.4	25.1	75	37.5
13	Kn/AIA (1.0/1.0)	60	53.3	29.1	40	66.6
14	ANA/Kn (0.25/4.5)	60	68.7	47.8	64.2	38.8
15	AIA (3.0)	60	83.3	58.3	89.4	73.3
16	AIA/BAP (1.0/1.0)	60	84.6	44	30	47

5.2. Inducción de raíces.

Al evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento sobre este proceso morfogénico, se encontró que en los explantes de las diferentes edades, se indujo la formación de raíces en los medios MS 9 (AIB 3.0 mg/L) y MS 15 (AIA 3.0 mg/L) suplementados individualmente con auxinas. Así como con la combinación de auxinas y citocininas del medio MS16 (AIA/BAP 1.0/1.0 mg/L) (Cuadro 3). Si bien estas dos auxinas promovieron la inducción de raíces, la mejor respuesta en los explantes de las tres edades probadas, se observó con AIA (3 mg/L). Sin embargo, en los explantes de cuatro meses se indujo la formación de raíces en el 100%, mientras que en los de 6, 9 y 14 meses de edad, respectivamente, se observó la inducción en el 25%, 53% y 67 % de los explantes (Cuadro 3).

Con la auxina (AIB) a la misma concentración la respuesta disminuyó proporcionalmente, aproximadamente en un 50% en los explantes de las cuatro edades, en relación a los porcentajes obtenidos con AIA (Figura 4). Mientras tanto en el medio MS 16 con la combinación auxina-citocinina (AIA/BAP 1.0/1.0 mg/L) se observó una disminución en la inducción de raíces de aproximadamente 20 % en los explantes de las plantas de 6, 9 y 14 meses de edad, con respecto a los obtenidos con la concentración de 3 mg/L de AIA (Figura 4). Sin embargo, en los explantes de cuatro meses se formaron raíces en el 100% al igual que con el AIA (Cuadro 3).

También se observó que en presencia de auxinas (MS 9 y MS 15) la emergencia de las raíces se inició en la base del explante a los 10 días de incubación, desarrollando de una a cinco raíces con abundantes pelos absorbentes, las cuales a los 30 días de incubación alcanzaron una longitud de 3 a 6 centímetros. Mientras que con la combinación de auxinas-citocininas (MS 16) la emergencia se inició a los 15 días de incubación, por explante se desarrollaron de una a tres raíces (Figura 3).

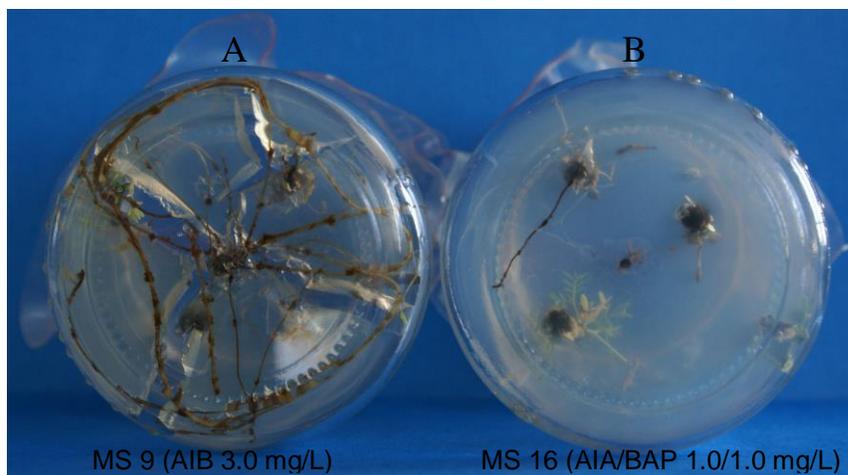


Figura 3. Aspecto de raíces desarrolladas en explantes de *P. laevigata* de cuatro meses de edad, en los medios MS 9 (A) y MS 16 (B), a los 30 días de incubación.

En los explantes de las diferentes edades del control y en los del medio MS 3 suplementado con 1mg/L de ANA no hubo respuesta; sin embargo, cuando esta auxina en bajas concentraciones (0.1 a 1.0 mg/L) se combinó con la cinetina (citocinina) a altas concentraciones (1 a 4.5 mg/L), como sucedió en los tratamientos MS 11 y MS 14, se indujo la rizogénesis en los explantes de cuatro y 14 meses de edad, en valores del 10% al 20 % (Cuadro 4). Los valores en los rangos en las concentraciones de los reguladores del crecimiento corresponden a los citados por Balboa *et al.* (1987), Jordan (1987) y Pierik (1987).

Los resultados muestran que la inducción de raíces en esta especie depende de la incorporación exógena de reguladores del crecimiento, ya que en ausencia de estos no hubo diferenciación de raíces. El proceso está, en gran medida, influenciado por la edad del explante, la concentración y el tipo de regulador de crecimiento. Los resultados muestran claramente que la capacidad de enraizamiento disminuye conforme incrementa la edad del explante, y que entre los diferentes reguladores utilizados las auxinas AIA y AIB fueron las mejores para la inducción de raíces a una

concentración de 3 mg/L; a concentraciones menores disminuye el porcentaje de enraizamiento.

El mayor porcentaje de inducción de raíces obtenido en explantes de cuatro meses puede atribuirse a que los tejidos jóvenes tienen un mayor contenido de AIA, el que al interactuar con las auxinas exógenas desencadenan un efecto sinérgico que favorece la inducción de primordios radicales. La disminución en el porcentaje de enraizamiento, aumenta con forme se incrementa la edad del explante, lo que puede atribuirse al hecho de que con el incremento la edad del tejido, también se incrementa la cantidad y actividad de la enzima AIA-oxidasa, la cual degrada el AIA y es responsable del menor contenido de esta auxina en los tejidos más viejos (Barba, 1988; Sánchez *et al.*, 2005 a). Hartmann y Kester, (1987) consideran que la inducción de los primordios radiculares está regulada, en primer lugar, por el contenido endógeno del AIA sintetizado en los primordios apicales y luego por las auxinas exógenas, para completar la etapa de iniciación y desarrollo del sistema radicular. En el presente trabajo es posible atribuir la diferencias observadas en los porcentajes de enraizamiento, en los explantes de mayor edad, a una variación en el balance óptimo de auxinas endógenas y exógenas, el cual afectó el proceso de enraizamiento, disminuyendo esta capacidad en los explantes más viejos, así como a una gran cantidad de tejido esclerenquimático en las ramas de plantas adultas, y a la acumulación de compuestos fenólicos en el tallo, los que interfieren con la formación de raíces (Balboa *et al.*, 1987).

En las especies del género *Prosopis* se han utilizado diferentes auxinas y combinaciones de auxinas-citocininas para inducir la formación de raíces en explantes de diferente edad y origen. Los resultados de este trabajo concuerdan con los obtenidos en segmentos nodales de *P. chilensis* en los que la mejor respuesta de inducción de raíces se observó en presencia de 3 mg/L de AIA y AIB en explantes de cuatro meses de edad, así como un decremento en la respuesta en explantes de mayor edad (Caro *et al.*, 2002).

En contraste con los resultados obtenidos, Batchelor *et al* (1989) encontraron que en explantes nodales de tres y 12 meses de edad de *P. cineria*, *P. chilensis* y *P. juliflora* la mejor respuesta de enraizamiento (75%) se indujo con una combinación de cinetina (0.05 mg/L) y AIB (15 mg/L). Sin embargo, Balboa *et al.* (1987), al utilizar yemas axilares de plantas de *P. chilensis* de cuatro meses de edad encontraron que el enraizamiento se indujo en el 73 % de los explantes con 5 mg/L de ANA.

En otras investigaciones, utilizando yemas axilares y ápices de plantas de nueve meses de edad de *P. alba*, *P. chilensis*, y *P. tamarugo*, se obtuvo la mejor respuesta de enraizamiento con una combinación de auxinas (ANA), citocininas (K) y giberelinas (AG) en rangos de concentración de 3 a 10 mg/L (Jordan *et al.*, 1985; Jordan, 1987).

Los resultados del presente trabajo, así como los de otros autores, muestran que hay una gran variación intra e interespecífica en la respuesta de inducción de raíces en explantes, tanto del mismo como de diferente origen y madurez fisiológica, así como a los diferentes reguladores de crecimiento. Estas diferencias se pueden atribuir a diversos factores entre los que destacan la incorporación de auxinas exógenas como el AIA y AIB. Se ha demostrado que un aumento en la concentración de auxinas exógenas promueven la división celular y organización de primordios radicales, y las altas concentraciones inhiben estas respuestas (Kantharay *et al.*, 1979), lo cual indica que la inducción de raíces depende de la adición exógena de auxinas y de los niveles endógenos del explante.

Otro factor determinante es de origen genético ya que hay evidencias de la existencia de un control de este tipo en la formación de raíces, dado que se han observado diferencias en la capacidad de enraizamiento entre especies de un mismo género (Hassig, 1986).

La inducción de raíces también se ve influenciada por factores fisiológicos entre los que destacan la edad de la planta, la época de recolección del material, y el

tipo y tamaño del explante. Entre otros autores Gaspar y Coumans (1987) y Couvillon (1988) han señalado que la coexistencia del proceso de crecimiento en los tejidos involucrados en la inducción de raíces, puede provocar efectos negativos o positivos en el enraizamiento, debido a que la redistribución de carbohidratos puede afectar el proceso, lo cual va a depender del estado fisiológico del explante.

Cuadro 3. Inducción de la rizogénesis a partir de yemas axilares obtenidas de plantas de *P. laevigata* de cuatro, seis, nueve y 14 meses de edad, cada valor representa el promedio de tres repeticiones, con 20 explantes por tratamiento.

Medio MS	Reguladores (mg/L)	No. de Explantes	Inducción de Raíz (%)			
			Meses			
			4	6	9	14
1	Testigo	60	—	—	—	—
2	ANA (1.0)	60	—	—	—	—
3	ANA/Kn (1.0/0.01)	60	—	—	—	—
4	BAP/GA3 (1.0/0.04)	60	12.5	—	—	—
5	ANA/BAP (0.5/1.0)	60	—	—	5.8	—
6	ANA/BAP (1.0/1.0)	60	—	—	—	—
7	AIB (1.0)	60	—	12.5	—	—
8	ANA/AIB (1.0/1.0)	60	—	—	5.5	27.2
9	AIB (3.0)	60	63.6	9	30	20
10	AIB (0.5)	60	—	39.1	—	—
11	ANA/Kn (0.1/1.0)	60	10.5	—	—	15.3
12	ANA/AIB (0.1/1.0)	60	—	—	19.6	—
13	Kn/AIA (1.0/1.0)	60	—	—	—	33.3
14	ANA/Kn (0.25/4.5)	60	25	—	—	16.6
15	AIA (3.0)	60	100	25	52.6	66.6
16	AIA/BAP (1.0/1.0)	60	100	12	30	47

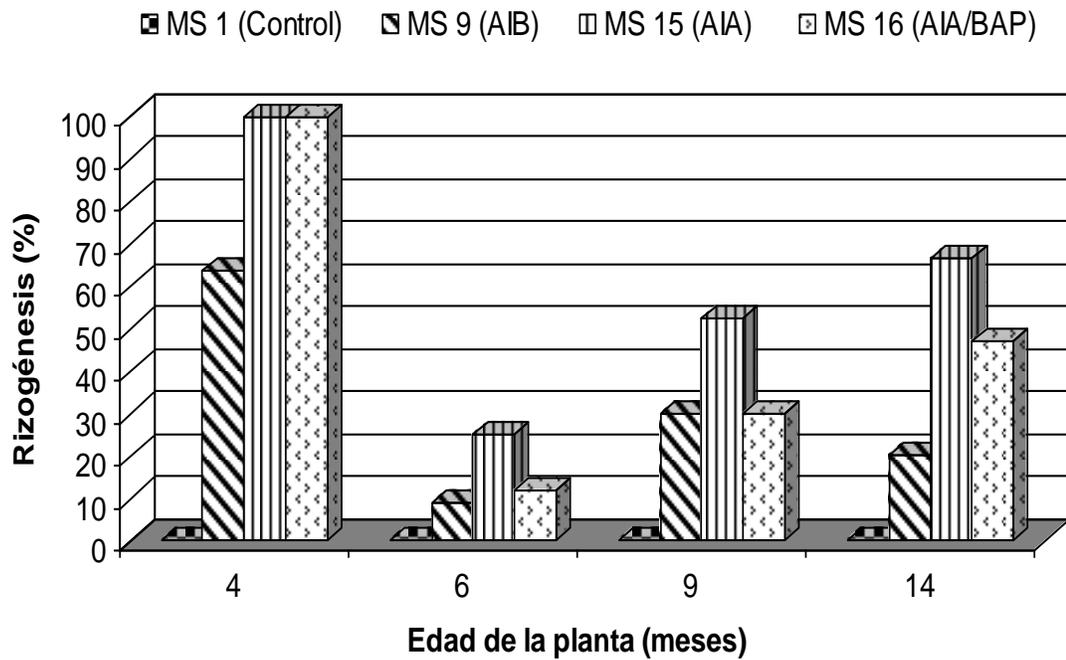


Figura 4. Efecto de la edad de la planta y la adición de reguladores del crecimiento sobre la inducción de la rizogénesis en yemas axilares de *P. laevigata*, extraídas de plantas de 4, 6, 9 y 14 meses de edad, sembradas en medio MS.

5.3. Desarrollo de brotes

En el presente trabajo se observó desarrollo de brotes en las yemas de las diferentes edades utilizadas, tanto en ausencia como en presencia de reguladores de crecimiento. Sin embargo, las mejores resultados se obtuvieron en los medios MS 9 (AIB 3.0 mg/L) y MS 15 (AIA 3.0 mg/L) suplementados individualmente con auxinas. Así como con la combinación de auxinas y citocininas del medio MS16 (AIA/BAP 1.0/1.0 mg/L). Si bien estas dos auxinas promovieron el desarrollo de brotes, la mejor respuesta en las yemas de las tres edades probadas se observó con AIA (3 mg/L). Aunque en las yemas de plantas de cuatro meses se indujo la brotación en el 94%, mientras que en las de seis, nueve y 14 meses de edad se observó la inducción en el 79%, 75% y 53 %, respectivamente (Cuadro 4).

Con la auxina (AIB) a la misma concentración la respuesta disminuyó proporcionalmente, aproximadamente en un 55% en las yemas de las cuatro edades en relación a los porcentajes obtenidos con AIA (Figura 5). Sin embargo, con el AIB (3mg/L) se observó brotación múltiple (dos a tres brotes) en las yemas de plantas de cuatro meses de edad (Figura 6). En el medio MS 16 con la combinación auxina-citocinina (AIA/BAP 1.0/1.0 mg/L) se observó una disminución en la inducción de brotes de aproximadamente 40%, 3%, 60% y 23% en las yemas de cuatro, seis, nueve y 14 meses de edad, respectivamente, con relación a los obtenidos con la concentración de 3 mg/L de AIA (Figura 5). En el resto de los tratamientos y en el control la respuesta fue menor y muy variable; en este último se observaron los porcentajes más bajos de respuesta, en un rango de 5% a 24 % (Cuadro 4). En todos los casos el desarrollo de las yemas inició aproximadamente a los diez días de incubación; sin embargo, se detectaron diferencias en la velocidad de desarrollo del tallo, observándose en los tratamientos MS 9, MS 13 y MS 15 los tallos de mayor longitud, mientras que en el control y el medio MS 3, MS 4 y MS 12 se desarrollaron tallos pequeños, de aproximadamente un centímetro de longitud (Figura 7).

Los resultados del trabajo muestran que, para *P. laevigata*, la edad del explante es un factor determinante para en la inducción de brotes, los tejidos jóvenes tiene mayor potencial, ya que tanto en ausencia como en las diferentes combinaciones de reguladores probadas, se observó el mayor porcentaje de brotes. El desarrollo de brotes en ausencia de reguladores se puede atribuir a que las yemas son explantes con meristemo preexistente, con crecimiento activo e información genética dirigida hacia la diferenciación de un tallo. Así como al hecho de que estos explantes tienen mayor contenido de auxinas endógenas, que al interactuar inducen la división, alargamiento y diferenciación celular (Rodríguez *et al.*, 2005).

Los resultados también indican que en esta especie las auxinas y citocininas están en una concentración idónea que permite el desarrollo de tallos en los explantes de las cuatro edades utilizadas, y que el desarrollo de estos no es dependiente de la incorporación de reguladores exógenos al medio de cultivo. Sin embargo, en esta especie, para obtener una buena proporción de brotes e inducir brotación múltiple es fundamental la adición de auxinas y/o citocininas.

El trabajo también muestra que la inducción de brotes disminuye conforme se incrementa la edad del explante, y que entre los diferentes reguladores utilizados, las auxinas AIA y AIB fueron las mejores para la inducción de brotes a una concentración de 3 mg/L, a concentraciones menores de éstas, disminuye el porcentaje de diferenciación de brotes. La disminución en el porcentaje de inducción de brotes a partir de yemas, en diferentes especies, se ha atribuido a que con la edad éstas pierden esta capacidad morfogénica y sintetizan menores concentraciones de auxinas que las yemas de plantas jóvenes (Rodríguez *et al.*, 2005; Orozco *et al.*, 2000).

Resultados similares a los del presente trabajo fueron reportados por Caro *et al.*, (2002) en segmentos nodales de *P. chilensis*, en los que la mejor respuesta de formación de brotes (80%), longitud de tallos y brotación múltiple se observó en presencia de 3 mg/L de AIA y AIB en explantes provenientes de plantas de cuatro

meses de edad, así como un decremento en la respuesta del material de plantas adultas. Sin embargo, Jordan (1987) trabajando con explantes nodales y ápices de plantas de nueve meses de *P. chilensis* y *P. tamarugo*, encontró que los mejores porcentajes en la inducción de brotes se obtuvieron con una combinación de auxinas y citocininas (ANA y cinetina) a una concentración de 1mg/L.

En contraste con los resultados del presente trabajo, Batchelor *et al.*, (1989) encontraron que en *P. cineria*, *P. chilensis* y *P. juliflora*, en explantes nodales de tres y 12 meses de edad, la mayor tasa de multiplicación se indujo con una combinación de cinetina (0.05 mg/L) y AIB (15 mg/L), mientras que en nudos cotiledonares de *P. glandulosa* de diez días de edad, se indujo brotación múltiple en presencia de 0.05 mg/L de cinetina (Rubluo *et al.*, 2002; Villegas, 2002). Por otra parte, en *P. laevigata* utilizando explantes cotiledónares de la misma edad se obtuvo brotación múltiple con una combinación de 2mg/L de 2,4-D y 1.5 mg/L de BA (Buendía *et al.*, 2007).

La brotación múltiple en diferentes especies se ha atribuido a la disminución de la dominancia apical, provocada por una concentración mayor de citocininas, con respecto a la de las auxinas en los tejidos o medios de cultivo (Barba, 1988, Suárez *et al.*, 2006). Los resultados de este trabajo indican que es posible que los explantes de *P. laevigata* contengan altos niveles endógenos de citocininas y que se establezca un mejor efecto sinérgico con el AIB que con el AIA, lo cual anula la dominancia apical y permite el desarrollo de 2 a 3 brotes por yema (Barba, 1988).

La tasa de multiplicación obtenida en los explantes de *P. laevigata* concuerdan con lo reportado para otras especies de *Prosopis* (Ramawat y Nandwani, 1991; Shekhawat *et al.*, 1993) y para la mayoría de las especies forestales (Ndoye *et al.*, 2003; Suárez *et al.*, 2006); la cual, por su misma naturaleza recalcitrante al cultivo *in vitro*, es menor a la obtenida en especies herbáceas (Amutha *et al.*, 2006). Las diferencias en la respuesta de inducción de brotes en las especies del género *Prosopis*, en diferentes combinaciones de auxinas y/o citocininas, indican que éstas se deben, entre otros factores, a diferencias genéticas y fisiológicas, y que se

requiere realizar más investigación sobre las combinaciones de citocininas o suplementos simultáneos de auxinas-citocininas para aumentar la tasa de multiplicación en las especies del género.

La disminución en la longitud de los tallos observada, en el presente trabajo, en los medios suplementados con BAP (MS 4) y cinetina (MS 3), en combinación con auxinas, puede atribuirse a un efecto antagónico. El efecto negativo en la longitud de los tallos por la incorporación de citocininas se a reportado en otras especies del género *Prosopis*, así como en otros géneros de interés forestal como *Balanites* (Ndoye *et al.*, 2003) y *Stevia* (Suárez *et al.*, 2006). Sin embargo, en roble (*Quercus* sp.) se ha encontrado que la BAP promueve la longitud de los tallos (Suárez *et al.*, 2006 b). Las diferencias en la respuesta se pueden atribuir al genotipo y al estado de madurez fisiológica del explante utilizado.

Cuadro 4. Inducción de brotes a partir de yemas axilares tomadas de plantas de *P. laevigata* de cuatro, seis, nueve y 14 meses de edad, cada valor representa el promedio de tres repeticiones, con 20 explantes por tratamiento

Medio MS	Reguladores (mg/L)	No. de Explantos	Inducción de brotes (%)			
			Meses			
			4	6	9	14
1		60	24	18	15	5
2	ANA (1.0)	60	31.5	17.3	28	11.1
3	ANA/Kn (1.0/0.01)	60	35.7	31	23.4	19
4	BAP/GA3 (1.0/0.04)	60	25	24	15.2	8
5	ANA/BAP (0.5/1.0)	60	38.4	20.8	21.2	17.2
6	ANA/BAP (1.0/1.0)	60	36.3	13	14	22
7	AIB (1.0)	60	30	12.5	26	15.3
8	ANA/AIB (1.0/1.0)	60	32	17	20.6	13
9	AIB (3.0)	60	50	35	30	23
10	AIB (0.5)	60	36	20.4	14	9.5
11	ANA/Kn (0.1/1.0)	60	31	28	30.3	25.2
12	ANA/AIB (0.1/1.0)	60	29	22	19	18.75
13	Kn/AIA (1.0/1.0)	60	40	20	20	25
14	ANA/Kn (0.25/4.5)	60	37	26.1	12	11.1
15	AIA (3.0)	60	94	79.6	75	53.3
16	AIA/BAP (1.0/1.0)	60	54	76	15	29.4

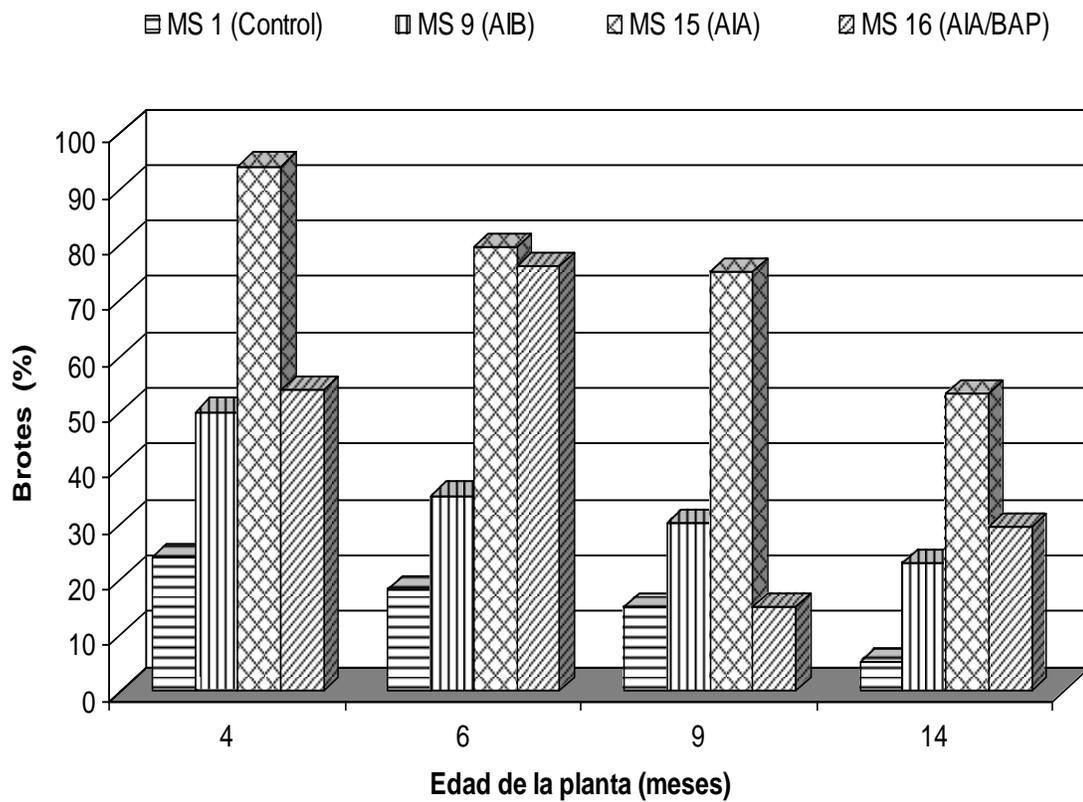


Figura 5. Porcentaje de brotes desarrollados a partir de yemas axilares de *P. laevigata* tomadas de plantas de cuatro, seis, nueve, y 14 meses de edad a los 30 días de incubación en medio MS.



Figura 6. Brotación múltiple en yemas de plantas de *P. laevigata* de cuatro meses de edad, en el medio MS 9 (AIB 3mg/L), a los 30 días de incubación.



Figura 7. Tamaño de los brotes desarrollados a partir de yemas de plantas de *P. laevigata* de cuatro meses de edad, en el medio MS 3 (ANA/KN 1.0/0.01mg/L) y MS 15 (AIA 3 mg/L) a los 30 días de incubación.

5.4. Desarrollo de plantas

Al evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento en el proceso de diferenciación de plántulas, se encontró que éste se indujo en los explantes de las diferentes edades, aunque esto sucedió únicamente en los medios MS 9 (AIB 3.0 mg/L) y MS 15 (AIA 3.0 mg/L), así como en la combinación de auxinas y citocininas del medio MS 16 (AIA/BAP 1.0/1.0 mg/L) (Figura 8). Si bien estas dos auxinas promovieron la diferenciación de plántulas, la mejor respuesta en los explantes de las cuatro edades se observó con AIA (3 mg/L). Sin embargo, en el 50% de los explantes de cuatro meses de edad se obtuvieron plántulas, mientras que en los de seis, nueve y 14 meses de edad se obtuvieron en el 16%, 31% y 30 % de los explantes, respectivamente (Figura 9).

Lo anterior contrasta con los resultados obtenidos en la inducción de raíces y brotes en los cuales las respuestas dependieron de la concentración de reguladores del crecimiento y la edad del explante (Barba, 1988; Rodríguez *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2005 a). El desarrollo de plantas completas se puede atribuir al balance endógeno y exógeno de reguladores del crecimiento. El contenido endógeno posiblemente promovió en primer lugar el desarrollo de tallos debido a la presencia de yemas, las cuales contienen meristemos preexistentes con información somática dirigida hacia la formación de un tallo, mientras que la inducción de raíces se presentó después debido a que su diferenciación depende principalmente de la incorporación de reguladores de crecimiento exógenos ya que en ausencia de estos no se observó desarrollo de raíces (Barba, 1988; Ramawat y Nandwani, 1991; Buendía *et al.*, 2007).

Los resultados también indican que el proceso de formación de plantas completas implica un mayor consumo de nutrientes, y la asimilación y redistribución de reguladores del crecimiento por lo cual sólo los explantes más jóvenes y con mayor vigor fueron capaces de formar plantas completas, ello indica que la obtención de plantas completas está determinada por la edad del explante y la concentración de reguladores.



Figura 8. Brotes con raíz desarrollados de yemas de plantas de *P. laevigata* de cuatro meses de edad, en el medio MS 15 (AIA 3 mg/L) y MS 16 (AIA/BAP 1/1 mg/L) a los 30 días de incubación.

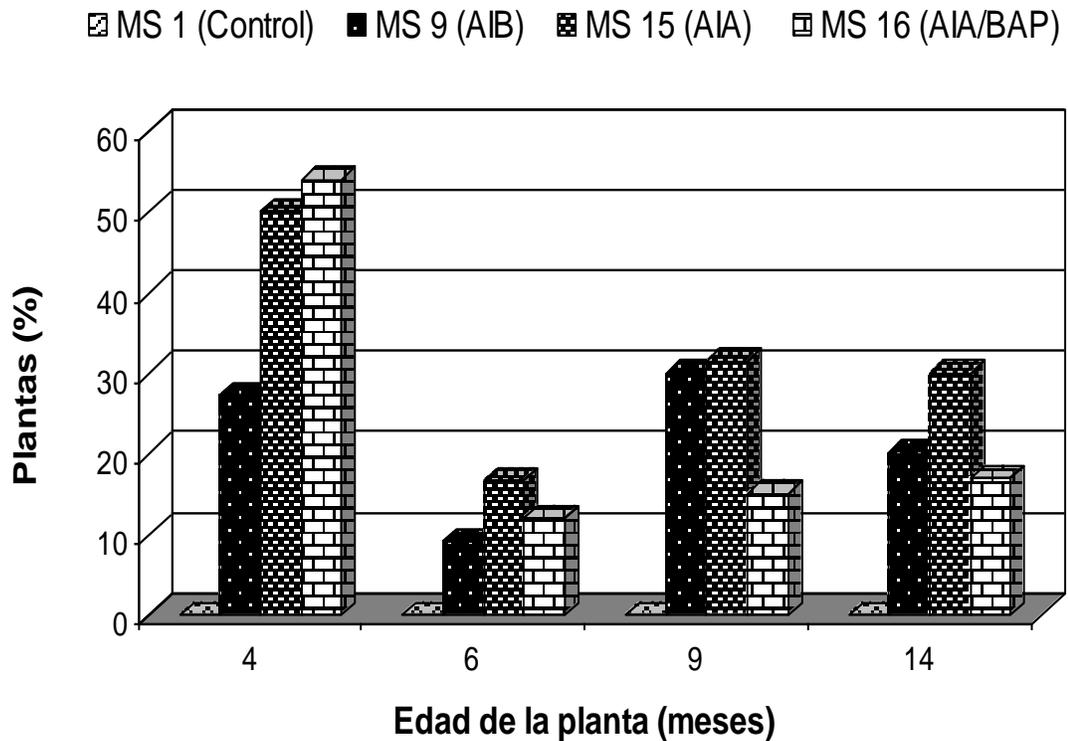


Figura 9. Efecto de la edad de la planta y la adición de reguladores del crecimiento sobre el desarrollo de plantas completas a partir de yemas axilares de *P. laevigata*, extraídas de plantas de cuatro, seis, nueve y 14 meses de edad, sembradas en medio MS.

6. CONCLUSIONES

1. La edad del explante es un factor determinante para la regeneración *in vitro* de *P. laevigata*, dado que de los explantes de las cuatro edades probadas, la mejor respuesta para la inducción de callo, raíces y desarrollo de brotes y plantas se obtuvo en los explantes de plantas más jóvenes (cuatro meses de edad).
2. Las auxinas promovieron la mejor respuesta en la inducción de callo, raíz y desarrollo de brotes y plantas completas.
3. La combinación BAP/GA₃ (1.0/0.04 mg/L) y ANA/Kn (1.0/0.01 mg/L) reduce la longitud de los brotes regenerados en los explantes de las cuatro edades probadas.

7.- LITERATURA CITADA

- Abedini, W; P. Boeri; L. Marinucci; M. Ruscitti; L. Celso.** 2000. Biotecnicas Aplicadas a Especies Forestales Nativas. Investigaciones Agrarias Sistema de Recursos Forestales. 9: 31-43.
- Aiazzi, M. T. J.; A. Aguello; A. Abril.** 1996. Nodulated and non-nodulated *Prosopis chilensis* (Mol.) St. Seedlings: economy of carbon and nitrogen. *In* Ecological Management. 89: 25-29.
- Aitken, J.; K. J. Horgan; T. A. Thorpe.** 1981 The influence of explant selection on the shoot forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*. Canadian Journal of Forest Research. 11: 112-117.
- Ammirato, P. V.** 1983. Recent progress in somatic embryogenesis. Newsletter. 57: 2-16.
- Ammirato, P. V. 1986.** Control and expression of morphogenesis in culture. *In*: Plant tissue and this agricultural applications. Withers L.A & Anderson P. G eds, University Press Cambridge. pp. 23-45.
- Amutha, S.; M. Muruganatham; A. Ganapathi.** 2006. Thidiazuron - induced high-frequency auxilliary and adventitious shoot regeneration in *Vigna radiata* (L.) wilczek. *In Vitro* Cellular and Dvelopmental Biology Plant. 42: 26-30.
- Arce, P; O. Balboa.** 1990. Some aspects of the biology of *Prosopis* growing in Chile. In: The Current State of Knowledge on *Prosopis juliflora*. (Eds.) M. A. Habit and J. C. Saavedra. FAO, Rome, Italy. pp. 313-322.
- Arya, S.; R. Tomar; O.P. Toky.** 1994. Effect of plantage and auxin treatment on rooting response in ítem cuttings of *Prosopis cineraria*. Journal of Arid Enviroments. 27: 99-103.

- Attree, S. J.; L. C. Fowke.** 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 35: 1-35.
- Balboa, O.; I. Cortes, O.; J. P. Arce.** 1987. Propagación vegetativa de *Prosopis*: investigaciones, problemas y perspectivas. *Interciencia*. 12: 27-31.
- Barba, A. A.** 1988. Reguladores del crecimiento vegetal. En: Hurtado D. V. M.; M. E. Merino M. (Eds.). Compañía Editorial Trillas, S.A. de C.V. México. pp. 48-66.
- Batchelor, C. A.; D. Yao; M. J. Koehler; P. J. C. Harris.** 1989. *In vitro* propagation of *Prosopis* species (*P. chilensis*, *P. cineraria* and *P. juliflora*). *Forest Tree Physiology*. 46: 110-112.
- Batchelor, C. A.** 1990. *In vitro* regeneration of tropical leguminous trees and shrubs with particular reference to the genus *Prosopis*. M. Phil/PhD transfer report, Department of Biological Sciences, Coventry University, Coventry, UK.
- Benson, L.** 1941. The mesquites and screw beans of the United States. *American Journal of Botany*. 28: 748-754.
- Bentham, G.** 1875. Revision of the suborder Mimoseae. *The Transactions of the Linnean Society of London* 30: 335-664.
- Bidwell, R. S. S.** 1979. Fisiología vegetal, AGT, editor. México. 475 p.
- Bisht, I. P.; V. K. Sharma; D. P. Uniyal.** 2003. *In vitro* Clonal Propagation of Mature Eucalyptus F1 Hybrid (*Eucalyptus tereticornis* SM. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). *Silvae Genetical*. 52: 3-4.
- Bonga, J. M.** 1981 Organogénesis *in vitro* of tissues from mature conifers. *In Vitro*. 17: 1511-1518.
- Bruce, Z.; T. John.** 1988. Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales (1ª. ed.), Compañía Editorial Limusa, S.A. de C.V. México. 545 p.

- Buendía, G. L.; J. Orozco V.; F. Cruz S.; V. M. Chávez Á.; E. J. Vernon C.** 2007. Clonal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd. M. C. Johnston). I. Via cotyledonary nodes. In Vitro Cellular and Development Biology – Plant. 43: 260-266.
- Burkart, A.** 1940. Materiales para una monografía del género *Prosopis*. (Leguminosae). Darwiniana. 4: 57-128.
- Burkart, A.** 1976. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae). Journal of the Arnold Arboretum. 57: 219-249.
- Burkart, A.; B. B. Simpson.** 1977. The genus *Prosopis* and annotated key to the species of the world. In: B. B. Simpson, Dowden, Hutchinson and Ross. (Ed.) Mesquite: Its Biology in Two Desert Ecosystems, Stroudsburg, Pennsylvania, USA. pp. 201-215.
- Caro, L. A.; P. A. Polci; L. I. Lindstrom; C. V. Echenique; L.F. Hernández.** 2002. Micropropagation of *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz from young and mature plants. Biocell 26: 25-33.
- CONANP-Dirección General de Manejo para la Conservación.** 2003. Programa de Manejo Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán. CONANP. México. 202p.
- CONAZA-Instituto Nacional de Ecología.** 1994. Mezquite. Folleto. México, D. F. 31p.
- Couvillon, G.** 1988. Rooting responses to different treatments. Acta Horticulturae. 227: 187-196.
- Carrillo, F. R.; F. Gómez Lorente; J. G. Arreola Avila.** 2007. Efecto de la poda sobre potencial productivo de Mezquites Nativos en la Comarca Lagunera, México. Chapingo Serie: Zonas Áridas. 5: 47-54.

- Endress, R.** 1994. Plant Regeneration: Morphogenesis, chapter 5. *In: Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 353 p.
- Ewens, M.; P. Felker.** 2003. The potential of mini- grafting for large- scale production of *Prosopis alba* clones. *Journal of Environments*. 55: 379-387.
- FAO/CIRF- Food and Agriculture Organization/California International Relations Foundation.** 1980. Recursos genéticos de especies arbóreas en las zonas áridas y semiáridas . Roma. p.136.
- Felger, R. S.** 1977. Mesquite in Indian cultures of Southwestern North America. *In: Mesquite: Its biology in two dessert shrub ecosystems*. Ed. Simpson, B. B. Dowden, Hutchinson and Ross. p. 26.
- Felker, P.; P. R. Clark.** 1981. Rooting of mesquite (*Prosopis*) cuttings. *Journal of Range Management*. 34: 446-448.
- Ffolliott, P.; J. Thames.** 1983. Manual sobre taxonomía de *Prosopis* en México, Perú y Chile. FAO: 1-35.
- Garg, V. K.** 1998. Interaction of tree crops with a sodic soil environment: potencial for rehabilitation of degraded environments. *Land Degradation and Development*. 9: 81-93.
- Garcia, A. E.; O. A. Martínez J.; S. Torres N.; J. T. Frías H.** 2000. Escarificación biológica de semillas de mezquite [*Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. Ex. Wild) M. C. Johnst.] con diferentes especies de ganado doméstico. *In: Frías, H. J. T.; V. Olalde P.; E. J. Vernon C. (Eds.). El mezquite árbol de usos múltiples. Estado actual del conocimiento en México*. Universidad de Guanajuato, México. pp. 117-123.
- Gaspar, Th.; M. Coumans.** 1987. Root formation. *In: Bonga, J.; Durzan D. (eds.) Cell and tissue culture in forestry . Vol. 2 pp. 202-217*. Dordrecht Martinus Nijhoff.

- George, E. F.** 1993. Plant propagation by Tissue Culture. The Technology. Part 1. Exegetics Ltd. Edington. 574 p.
- Gupta, P. K.; D. J. Durzan.** 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Reports. 4: 177-179.
- Gupta, P. K.; G. Pullman; R. Timmis; M. Kreitinger; W. Carlson; J. Grob; E. Welty.** 1993. Forestry in the 21st century. The biotechnology of somatic embryogenesis. Biotechnology. 11: 454-459.
- Gutiérrez, C. B.; R. Ipinza C.** 1998. La Multiplicación Clonal en el Mejoramiento Genético Forestal. *In:* Gutiérrez, C. B., R. Ipinza C., y V. Emhart (Eds.). CURSO: Mejora Genética Forestal Operativa. Universidad Austral de Chile. pp. 201-230.
- Gutiérrez, C. B.; R. Ipinza; P. Chung.** 1994. Propagación vegetativa y silvicultura clonal en eucaliptos. Ciencia e Investigación Forestal. 8: 139-175.
- Hartmann. H. T.; D. E. Kester.** 1987. Propagación de plantas. Principios y practicas. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V., México. 760 p.
- Hartmann, H.; D. Kester; F. Davies; R. Geneve.** 1997. Plant Propagation: Principles and Practices. Ed. Prentice Hall. New Yersey. 770 p.
- Hassig, B. E.** 1986. Metabolic process in adventitious rooting of cuttings. *In:* Jackson, M. B. (Eds.) New Root Formation in Plants and Cuttings. Martinus Nijhoff Publishers, Dor-drecht. The Netherlands. pp. 141-190.
- Hudson, T. H. K.; E. Dale.** 1994. Propagación de Plantas. Principios y prácticas. University of California, Davis, (3^a. ed.), Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. México. 760 p.
- INEGI-Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.** 2000. Carta Uso del Suelo y Vegetación F- 14-11. Pachuca Hidalgo. Reimpresión.

- Izquierdo, J.; P. Palomino.** 1996. Técnicas convencionales y biotecnológicas para la propagación de plantas de zonas áridas. FAO/PNUMA. Serie: Zonas Áridas y Semiáridas. 9: 126-144.
- Jiménez, G. E. A.** 1998. Generalidades del Cultivo *in vitro*. *In: Pérez P. J. N. (Eds.). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología.* Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara. Villa Clara. Cuba. pp. 13-122.
- Johnston, M.** 1962. The North American Mesquites. *Prosopis Sect. Algarobia (Leguminosae).* Brittonia. 14: 72-90.
- Jordan, M.** 1987. In vitro culture of *Prosopis* Species. *In: Bonga, J.M.; D. J. Durzan (Eds.) Cell and Tissue Culture in Forestry. Volume 3.* Martinus Nijhoff Publishers. Canada. pp. 370-384.
- Jordan, M.** 1996. Métodos de propagación biotecnológicos y convencionales de leguminosas de usos múltiples para zonas áridas. *In: Izquierdo, J; G. Palomino. (Eds.). Técnicas convencionales y biotecnológicas para la propagación de plantas de zonas áridas.* Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe, Santiago, de Chile. pp. 111-150.
- Jordan, M.; J. Pedraza; A. Goreux.** 1985. "In Vitro Propagation Studies of three *Prosopis* Species (*P. alba*, *P. chilensis* and *P. tamarugo*) Through Shoot-tip Culture" – Laboratorio de Botánica, Facultad de Cs. Biológicas, Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.-*Gartenbauwissenschaft.* 50: 265-267.
- Jordan, M.; I. Cortes; A. Goreux.** 1987. Potentialities of Cell and Callus Tissue Culture to Regenerate Two Mesquite Species (*Prosopis tamarugo* and *P. chilensis*). *Gartenbauwissenschaft.* 52: 166-169.
- Joshi, B.I.; P. Bisht; V. K. Sharma; D. P. Uniyal.** 2003. *In vitro* Clonal Propagation of Mature Eucalyptus F1 Hybrid (*Eucalyptus tereticornis* SM. X *E. grandis* Hill ex. Maiden). *Silvae Genetica* 52: 110-113

- Kantharay, G.; S. Mahadevan; G. Padmanaban.** 1979. Early biochemical events during adventitious root initiation in the hypocotyls of *Phaseolus vulgaris*. *Phytochem.* 18: 383-387.
- Klass, B. B. S.; R. L. Bingham; L. Finkner-Templemen; P. Felker.** 1985. Optimizing the environment for rooting cuttings of highly productive clones of *Prosopis alba* (mesquite/ algarrobo) *Journal of Horticultural Science.* 60: 275-284.
- López, F.; Y. L.; M. F. Goycoolea; M. A. Valdéz; A. M. Calderón de La Barca.** 2006. Goma de Mezquite: Una Alternativa de uso industrial. *Interciencia.* 31: 183-189.
- Magallanes, C. M. E.** 1997. Aplicación de la Tecnología del Cultivo *in vitro* en la Propagación de Especies Forestales. *In: Vargas, H. J. J., B. Bermejo V., y F. T. Leding (Eds.). Manejo de Recursos Genéticos Forestales.* Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. México. pp. 229-240.
- Maldonado-Aguirre, L. J.; F. E. de la Garza de la P.** 2000. El mezquite en México: Rasgos de importancia productiva y necesidades de desarrollo. *In: Frías, H. J. T.; V. Olalde P.; E. J. Vernon C. (Eds.). El mezquite árbol de usos múltiples. Estado actual del conocimiento en México.* Universidad de Guanajuato, México. pp. 37-50.
- Marks, T. R.; S. E. Simpson.** 1994. Factors affecting shoot development in apically dominant. Acer cultivars in vitro. *Journal of Horticultural Science.* 69: 543-551.
- Martínez, R. O. A.; J. Rivera M.; E. Santamaría C.** 2000. Evaluación de 25 tratamientos pregerminativos en semillas de mezquite (*Prosopis velutina* Wooton) en áreas de influencia de la URUZA. *In: Frías, H. J. T., V. Olalde P. E. J. Vernon C. (Eds.). El mezquite árbol de usos múltiples. Estado actual del conocimiento en México.* Universidad de Guanajuato, México. pp. 37-50.
- McDonough, W. T.** 1977. Seed physiology. *Intermonitain Forest and Range USDA.* Forest Service. USA.

- Murashige, T.; F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. pp. 473-497.
- Nandwani, D.; K. G. Ramawat.** (1991). Callus-culture and plantlets formation from nodal explants of *Prosopis juliflora* (Swartz) DC. *Indian Journal of Experimental Biology*. 29:523-527.
- Navarro, U. S.; R. Vera E.** 1988. Historia del cultivo de tejidos vegetales. *In*: Hurtado, M. D. V., y M. E. Merino M. (Eds.). *Cultivo de Tejidos Vegetales* (1ª. ed.), Compañía Editorial Trillas, S.A. de C.V. México. pp. 15-34.
- Ndoye, M.; I. Diallo; Y. K. Gassama/Dia.** 2003. *In vitro* multiplication of the semi-arid forest tree, *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. *African Journal of Biotechnology*. 2: 421-424.
- Orozco, V. J., S. Meráz V., J. A. Lechuga C., F. Cruz S., y E. J. Vernon-Carter.** 2000. Estudios preliminares sobre micropropagación de *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. Ex. Wild) M. C. Johnst. *In*: Frías, H. J. T.; V. Olalde P.; E. J. Vernon C. (Eds.). *El mezquite árbol de usos múltiples. Estado actual del conocimiento en México*. Universidad de Guanajuato, México. pp. 133-142.
- Ovalle, C.; L. Longeri; J. Aronson; A. Herrera; J. Avendano.** 1996. N₂ fixation, nodule efficiency and biomass accumulation after two years in three Chilean legume trees and *Tagasaste Chamaecytisus proliferus* Subsp., *palmensis*. *Plant and Soil*. 179: 131-140.
- Pandit, B. R.** 1996. An ordination of plant communities in a reserved forest near Bhavnagar. *Indian J. for* . 19: 278-282.
- Pasiecznik, N. M.; P. Felker; P. J. C. Harris; L. N. Harsh; G. Cruz; J.C. Tewari; K. Cadoret; L.J. Maldonado.** 2001. *The Prosopis juliflora -Prosopis pallida* Complex: A Monograph. HDRA, Coventry, UK. pp.172.

- Pierik, R. L. M.** 1987. In vitro culture of higher plants. In: Kluwer Academic Publishers, B. V. Martinus Nijhoff Publishers (3^a. ed.), Departament of Horticulture, Agricultural University Wageningen, The, Netherlands. 326 p.
- Pisani, J. M.; R. A. Distel.** 1998. Inter-and Intraspecific variation in production of spines and phenols in *Prosopis caldenia* and *Prosopis flexuosa*. Journal of Chemical Ecology. 24: 23-36.
- Pisani, J. M.; R. A. Distel.** 1999. Production of phenols and spines in response to shoot damage in *Prosopis caldenia* and *Prosopis flexuosa*. Journal of Chemical Ecology. 25: 1141-1150.
- Prehn, D.; C. Serrano, A. Mercado; C. Stange; L. Barrales; P. Arce-Johnson.** 2003. Regeneration of whole plants from apical meristems of *Pinus radiata*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 73: 91-94.
- Ramawat, K. G.; D. Nandwani.** 1991. Propagation of *Prosopis species*: problem perseverance and perspectives. Annals of Arid Zone. 30: 247-258.
- Ramírez, R. G.; J. B. Quintanilla; J. Aranda.** 1997. White-tailed deer food habits in northeastern México. Small Ruminant Research. 25: 141-146.
- Rodríguez, R.; C. Álvarez; L. M. Centeno; B. Berros; A. Rodríguez.** 2005. Embrionogénesis somática y estrategias para superar las limitaciones en leñosas In: Sánchez, O. M. E.; D. G. Ríos L. (Eds.). Biotecnología vegetal en especies leñosas de interés forestal, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Chile. pp. 63-78.
- Rubluo, A.; E. Arriaga; I. Brunner.** 2002. Shoot production from cotyledons of *Prosopis glandulosa* var. *torreyana* cultured in vitro. Anales del Instituto de Biología, Universidad. Nacional. Autónoma de México. Serie. Botánica. 73: 83-87.

- Rzedowski, J. L.** 1988. Análisis de la Distribución Geográfica del Complejo *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae) en Norteamérica. *Acta Botánica Mexicana*, México. 3:7-19.
- Sanchez, O. M.; D. Ríos; M. A. Revilla; R. Rodríguez.** 2005 a. Factores involucrados en el enraizamiento *in vitro* de leñosas de interés agroforestal. *In: Sánchez, O. M. E.; D. G. Ríos L. (Eds.). Biotecnología vegetal en especies leñosas de interés forestal*, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Chile. pp. 95-118.
- Sanchez, O. M. E.; D. G. Ríos L.; R. Escobar R.** 2005 b. La biotecnología vegetal y el mejoramiento genético de especies leñosas de interés forestal y sus proyecciones en Chile. *In: Sánchez, O. M. E.; D. G. Ríos L. (Eds.). Biotecnología vegetal en especies leñosas de interés forestal*, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Chile. pp. 17-28.
- Segura, J.** 2000. Introducción al Desarrollo. Concepto de Hormona Vegetal. *in: Azcón-Bieto, J.; M. Talón (Eds.). Fundamentos de Fisiología Vegetal (1ª. ed.)*, McGRAW-HILL/INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S. A. U. pp. 285-303.
- Shenk, R. V.; A. C. Hildebrandt.** 1972. Medium and techniques for induction and growth of momocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.
- Shekhawat, N. S.; T.S. Rathore; R. P. Singh; N. S. Deora; Rao, S. R.** 1993. Factors affecting *in vitro* clonal propagation of *Prosopis cineraria*. *Plant Growth Regulation.* 12: 273-280.
- Simpson, B. B.; O. T. Solbrig.** 1977. Mesquite. *In: Mesquite, its biology in two desert scrub ecosystems.* Simpson, B. B. (ed.). Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. Stroudsburg Penn. pp. 1-21.
- Solanki, K. R.; N. L. Kackar; S. K. Jindal.** 1984. Propagation in *Prosopis cineraria* (L.) MacBride by air layering. *Current Science.* 53: 1166-1167.

- Suárez, I. E.; A. J. Jarma; M. Avila.** 2006. Desarrollo de un protocolo para la propagación in vitro de Roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). Temas Agrarios. 11: 52-65.
- Thakur, A. K.; S. Sharma; D. K. Srivastava.** 2005. Plant regeneration and genetic transformation studies in petiole tissue of Himalayan poplar (*Populus ciliate* Wall.). Current Science. 98: 664-668.
- Tisserat, B.; E. B. Esan; T. Murashige.** 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. Horticultural Review. 1: 1-78.
- Torres N. S.; O. A. Martínez J.; E. García A.; J. T. Frías H.** 2000. Escarificación hídrica de semillas de mezquite [*Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. Ex. Wild) M. C. Johnst.]. In: Frías, H. J. T.; V. Olalde P.; E. J. Vernon C. (Eds.). El mezquite árbol de usos múltiples. Estado actual del conocimiento en México. Universidad de Guanajuato, México. pp. 125-131.
- Trigiano, R. N.; R. L. Geneve; S.A. Merckle.** 1992. Tissue and cell culture of woody legumes. Horticultural Review. 14: 265-331.
- Villalobos, A.; V. M.; T. A. Thorpe; E. C. Yeung.** 1983. El papel del cultivo de tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo. 51: 43-59.
- Villegas, F.; E. Cruz.** 2002. Shoot production from cotyledons of *Prosopis glandulosa* var. *torreyana* cultured in vitro. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México 73: 83-87.
- Walton, T.; P. J. C. Harris; C. A. Batchelor.** 1990. Comparative rooting response of shoot tips from six *Prosopis* species. Nitrogen Fixing Tree Research Reports. 8: 154-155.
- Wojtusik, T.; M. T. Boyd; P. Felker.** 1994. Effect of different media on vegetative propagation of *Prosopis juliflora* cuttings under solar-powered mist. Forest Ecology Management. 67: 267-271.

Zobel, B. J.; J. T. Talbert. 1992. Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. LIMUSA/Grupo NORIEGA EDITORES (1ª. reimpresión) – México. 545p.

8.- APÉNDICES

Apéndice A. Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962).

Compuesto	Cantidad por litro	Molaridad
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440 mg/L	2.992 x 10 ⁻³
NH ₄ NO ₃	1650 mg/L	2.061 x 10 ⁻²
KNO ₃	1900 mg/L	1.879 x 10 ⁻²
KI	0.83 mg/L	4.90 x 10 ⁻⁶
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025 mg/L	1.72 x 10 ⁻⁷
KH ₂ PO ₄	170 mg/L	1.249 x 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	6.2 mg/L	1.000 x 10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25 mg/L	1.000 x 10 ⁻⁶
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370 mg/L	1.501 x 10 ⁻³
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3 mg/L	7.620 x 10 ⁻⁵
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025 mg/L	1.001 x 10 ⁻⁷
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8.6 mg/L	2.990 x 10 ⁻⁵
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.81 mg/L	1.007 x 10 ⁻⁴
Na ₂ EDTA	37.31 mg/L	1.002 x 10 ⁻⁴
Tiamina	1.0 mg/L	2.400 x 10 ⁻⁶
Meso-inositol	100.0 mg/L	5.550 x 10 ⁻⁴
A. C. Nicotínico	0.5 mg/L	4.061 x 10 ⁻⁶
Glicina	2.0 mg/L	2.660 x 10 ⁻⁵

* Todas las cantidades están dadas por litro de solución a menos que se indique otra cosa.

Apéndice B. Composición de las soluciones concentradas del medio Murashige y Skoog.

<u>Solución (A) (100 X)</u>	
Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	$2.992 \times 10^{-1} \text{ M}$
<u>Solución (B) (10 X)</u>	
Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	$2.061 \times 10^{-1} \text{ M}$
Nitrato de potasio (KNO_3)	$1.879 \times 10^{-1} \text{ M}$
<u>Solución (C) (100 X)</u>	
Yoduro de potasio (KI)	$4.999 \times 10^{-4} \text{ M}$
Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	$1.720 \times 10^{-5} \text{ M}$
<u>Solución (D) (100 X)</u>	
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	$1.249 \times 10^{-1} \text{ M}$
Ácido bórico (H_3BO_3)	$1.002 \times 10^{-2} \text{ M}$
Molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	$1.033 \times 10^{-4} \text{ M}$
<u>Solución (E) (100 X)</u>	
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	$1.501 \times 10^{-1} \text{ M}$
Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	$7.622 \times 10^{-3} \text{ M}$
Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	$2.990 \times 10^{-3} \text{ M}$
Sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	$1.000 \times 10^{-5} \text{ M}$
<u>Solución (F) (200 X)</u>	
Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	$2.003 \times 10^{-2} \text{ M}$
Ácido etilendiaminotetracético (sal disódica)	$2.001 \times 10^{-2} \text{ M}$

* Todas las cantidades están dadas por litro de solución a menos que se indique otra cosa.

Apéndice C. Soluciones para preparar un litro de medio Murashige y Skoog.

Solución	Cantidad (mL)	
A	10	mL
B	100	“
C	10	“
D	10	“
E	10	“
F	5	“
Cóctel 2	10	“
Agar	7	gr
Azúcar	30	gr