

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



“Técnicas de propagación asexual en la especie *Cordia elaeagnoides* A. DC.
(Boraginaceae)”

TESIS PROFESIONAL

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA
PRESENTA:**

NANCY NUÑEZ SANDOVAL

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, Junio del 2009



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología

1403/ C. C. BIOLOGÍA

C. NANCY NUÑEZ SANDOVAL

PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: Tesis e Informes opción: Tesis con el título : "Técnicas de propagación asexual en la especie *Cordia elaeagnoides* A. DC (Boraginaceae)" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo al Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba y como asesor al Dr. Rafael Soltero Quintana.

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan., 21 de noviembre del 2008.

DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



M en C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

M.C. Georgina Quiroz Rocha
Presidente del Comité de Titulación.
Licenciatura en Biología.
CUCBA.
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **tesis e informes**, opción **tesis** con el título: "**Técnicas de propagación asexual en la especie *Cordia elaeagnoides* A. DC. (Boraginaceae)**" que realizó la pasante **Nancy Nuñez Sandoval** con número de código **B03008312** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
Las Aguas, Zapopan, Jal., 19 de Mayo del 2009

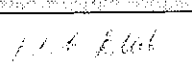

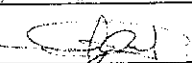
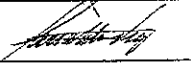


Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba
Director



Dr. Rafael Soltero Quintana
Asesor

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Liberato Portillo Martínez		19-05-09
Dr. Ramón Rodríguez Macías		19-05-09
Ing. Raymundo Ramírez Delgadillo		19-05-09
Supl. Dra Ana Lilia Viguera		19-05-09

Agradecimientos

A DIOS: Por otorgarme todas las herramientas para superarme.

A MIS PADRES: Antonia y Francisco por todo su amor, apoyo y presencia durante todos mis días.

A MIS HERMANOS: Javier, Lupita y Lucía por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A MIS MAESTROS: Por darme herramientas intelectuales para andar la vida profesional.

A ULISES FERNÁNDEZ: Por que simplemente sin tu apoyo no hubiera podido culminar.

A FABIÁN ELIZONDO: Sobre todo por tu paciencia y por permanecer a mi lado siempre y a pesar de la adversidad.

AL DR. FERNANDO SANTACRUZ: Por su apoyo en la realización de esta investigación.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS: Con quien pase excelentes momentos.

GRACIAS.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES	3
2.1.- La vegetación en México.	3
2.2.-Utilidad de los bosques: Efectos de la deforestación.	4
2.3.- Situación de los bosques en el mundo.	5
2.3.1 Situación de los bosques en México.	6
2.4.-Descripción botánica.	7
2.4.1.-Familia Boraginaceae.	7
2.4.2.- <i>Cordia elaeagnoides</i> A.DC. (Boraginaceae).	8
2.5.-Propagación de plantas.	10
2.5.1.-Propagación sexual.	10
2.5.2.-Propagación asexual.	12
2.5.3.-El cultivo <i>in vitro</i> .	12
2.6.- Fisiología del cultivo <i>in vitro</i> .	13
2.6.1.-Cultivo <i>in vitro</i> de especies forestales.	16
2.7.-Silvicultura clonal.	18
3.- JUSTIFICACIÓN	19
4.-HIPÓTESIS	20
5.-OBJETIVOS	20
6.-MATERIAL Y MÉTODOS	21
6.1.- Rescate de embriones y propagación masiva de <i>Cordia elaeagnoides</i>	21
6.2.- Proliferación de yemas axilares en brotes de <i>Cordia elaeagnoides in vitro</i> .	21

6.3.- Control de oxidación <i>in vitro</i> de explantes de <i>Cordia elaeagnoides</i> .	22
6.4.- Inducción de rizogénesis y elongación de tallos.	23
6.5.- Establecimiento de estacas de <i>Cordia elaeagnoides</i> en invernadero.	24
6.5.1.- Establecimiento de estacas de <i>Cordia elaeagnoides</i> : Pruebas con enraizadores y sustratos.	24
6.5.2.- Establecimiento de estacas de <i>Cordia elaeagnoides</i> : Pruebas con tapete térmico.	25
6.6.- Análisis estadístico.	25
7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
7.1.- Rescate de embriones y propagación masiva de <i>Cordia elaeagnoides</i> .	26
7.2.- Proliferación de yemas axilares en brotes de <i>Cordia elaeagnoides</i> .	28
7.3.- Control de oxidación en explantes.	30
7.4.- Inducción de rizogénesis y elongación de tallos.	31
7.5.- Establecimiento de estacas de <i>Cordia elaeagnoides</i> en invernadero.	34
7.5.1.- Establecimiento de estacas: Pruebas con enraizadores y sustratos.	34
7.5.2.- Establecimiento de estacas: Pruebas con tapete térmico.	35
8.-CONCLUSIONES	39
9.-RECOMENDACIONES	39
10.-LITERATURA CITADA	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos para el control de oxidación en explantes de <i>Cordia elaeagnoides</i> .	22
Cuadro 2. Tratamientos para la inducción de raíces.	24
Cuadro 3. Comparación múltiple de medias para el número de brotes de <i>Cordia elaeagnoides</i> estimuladas en diferentes reguladores de crecimiento a los 45 d. Prueba LSD (Diferencias Mínimas Significativas).	29
Cuadro 4. Comparación múltiple de medias para el número de raíces de <i>Cordia elaeagnoides</i> estimuladas en diferentes concentraciones de ácido indol 3-butírico (AIB) a los 45 d. Prueba LSD (Diferencias Mínimas Significativas).	32
Cuadro 5. Comparación múltiple de medias para el número de brotes de <i>Cordia elaeagnoides</i> estimuladas por la luz después de los 45 d. Prueba LSD (Diferencias Mínimas Significativas).	33
Cuadro 6. Comparación múltiple de medias para elongación de brotes de <i>Cordia elaeagnoides</i> estimuladas por la luz después de los 45 d. Prueba LSD (Diferencias Mínimas Significativas).	34

ÍNDICE DE FIGURAS.

- Figura 1:** Variación neta anual de la superficie forestal mundial 2000-2005 5
(FAO, 2007).
- Figura 2:** Distribución de *Cordia elaeagnoides* (Pennington y Sarukhán, 9
2005).
- Figura 3:** Propagación *in vitro* de *Cordia elaeagnoides*: Establecimiento y 36
Proliferación.
- Figura 4:** Propagación de *Cordia elaeagnoides*: Enraizamiento *in vitro* y 37
propagación por estacas.
- Figura 5:** Propagación por estacas de *Cordia elaeagnoides*: Pruebas con 38
tapete térmico.

RESUMEN

Cordia alliodora A.DC., es un árbol maderable que habita en el bosque tropical caducifolio y subcaducifolio ubicado en la vertiente del pacífico de México, el cual por la belleza de su madera es explotada de las poblaciones naturales. Las dificultades para su propagación sexual nos llevan a probar vías alternas para multiplicarla asexualmente. Para su establecimiento se llevo a cabo la técnica de rescate de embriones, donde los embriones sanos fueron cultivados exitosamente en medio de cultivo MS adicionado con 2 mg/L de BA. Posteriormente se probaron diferentes tratamientos para su proliferación por medio de yemas axilares aplicando tres tipos de regulador: 2-isopentiladenina (2ip), Cinetina (Kin) y Benciladenina (BA), cada uno en tres concentraciones (1, 2 y 3 mg/L) y dos tipo de medio de cultivo (MS y McCown's) en un diseño multifactorial. Se obtuvo que los reguladores Kin y BA fueron mejores y en concentraciones de 1 y 2 mg/L son más eficientes. Se probaron tres antioxidantes nitrato de plata (1 mg/L), carbón activado (3 g/L) y una solución estéril de ácido cítrico y ácido ascórbico (200mg/L c/u) en un diseño multifactorial. Los resultados demostraron que la aplicación de nitrato de plata es de vital importancia para el control de oxidación en *Cordia alliodora*. Para la fase de enraizamiento y elongación de tallos se establecieron dos experimentos; el primero probó la utilización de tres niveles de ácido indol-3butírico (AIB) (0, 2.5 y 5 mg/L), aplicación de adenina (40 mg/L) y finalmente intensidad lumínica de 1500 lux y etiolación. El segundo experimento es igual al anterior más la adición de antioxidantes nitrato de plata (1 mg/L), carbón activado (3 g/L) y baños de solución de ácido cítrico y ácido ascórbico (200mg/L c/u). La aplicación de AIB en cualquiera de sus concentraciones es necesaria para el enraizamiento, además la exposición a la luz permitió una mayor elongación. La aplicación de antioxidantes evita el enraizamiento.

1. INTRODUCCIÓN

La ubicación geográfica del territorio mexicano le otorga una cantidad de características ambientales que le permite albergar a un sin número de especies. Su fisiografía, geología, orografía, la extensión de sus litorales entre otras características, le permite hospedar no sólo a especies de amplia o reducida distribución, sino también convertirse en una zona rica en endemismos considerada con un 52% de especies endémicas (Rzedowski, 1983).

La combinación de las características de la República Mexicana provoca una innumerable cantidad de climas y microclimas, en donde se desarrollan de acuerdo a Standley (citado en Rzedowski 1983), aproximadamente 20,000 especies de plantas vasculares, las cuales habitan y se distribuyen dentro de los diez diferentes tipos de vegetación del país mexicano. Entre los que se encuentra el bosque tropical caducifolio y bosque tropical subcaducifolio, hábitat de la especie de estudio, *Cordia elaeagnoides*, un árbol de importancia maderable; cuyas características de durabilidad, resistencia, usos medicinales y ornamentales le otorga un valor comercial muy alto. Sin embargo, debido a la demanda comercial y a la ineficiencia de los procesos de propagación sexual, se ha visto en la necesidad de explotar las poblaciones naturales de *C. elaeagnoides*, sumándose así al aumento de la tasa de deforestación, lo que coloca a México en segundo lugar a nivel América Latina y sexto a nivel mundial, perdiendo más de ochocientas mil hectáreas de cobertura vegetal forestal anualmente (Morán, 2002).

La propagación vía asexual se ha convertido en una alternativa excelente para muchas especies tanto de importancia comestible, ornamental, maderable o simplemente con la finalidad de conservar el material genético de especies en peligro de extinción. Entre estos métodos se encuentra la propagación por estacas, esquejes o acodos; los cuales han sido muy útiles para muchas especies vegetales. Sin embargo, el número de individuos generados es directamente proporcional al material vegetal que es requerido.

El cultivo *in vitro* ha tomado fuerza en los últimos años debido a que otorga ventajas sobre los métodos convencionales, principalmente la obtención de organismos completamente sanos, además de poder generar cultivos en masa a partir de tejido o incluso de una sola célula.

Una de las características de los métodos de propagación asexual radica en la poca variabilidad genética que se genera en un cultivo, por lo que se vuelve más susceptible a los factores ambientales no controlados o hacerlo más vulnerable a plagas y enfermedades. Por la urgente necesidad de reforestar los bosques mexicanos, el uso de técnicas de cultivo *in vitro* permitiría sobrellevar estos problemas por medio de un control y manejo integrado de los individuos clonados, logrando así el restablecimiento de las poblaciones naturales de *C. elaeagnoides* y por lo tanto restándole peso a la sobreexplotación de otras especies.

2. ANTECEDENTES

2.1 La vegetación en México.

La ubicación geográfica de México es privilegiada, debido a que se encuentra repartido en ambos lados del trópico de cáncer, compartiendo territorio en sus extremos con la parte neotropical y holártica, siendo un punto de unión entre ambos extremos. Su ubicación aunado a su historia geológica como corredor biológico entre Norteamérica y Sudamérica, lo volvió un punto importante dentro de la evolución, colocándose como un centro de origen y diversificación de muchas especies.

La fisonomía del territorio mexicano le permite albergar una riqueza florística muy importante, alrededor de 22,000 especies organizadas en 220 familias y 2,410 géneros aproximadamente (Rzedowski, 1981); las cuales le otorgan características distintivas a cada uno de los tipos de vegetación presentes en el país. Dentro del territorio se reconocen diez principales tipos de vegetación, entre los que se encuentran tres diferentes bosques tropicales: (Rzedowski, 1983).

1. Bosque tropical perennifolio: Es donde se concentra la vegetación más exuberante de la tierra debido a las pocas limitantes ambientales que existen, se desarrolla a altitudes entre los 0 y 1,000 msnm, La temperatura media anual oscila entre los 11 y 18 °C, la precipitación promedio se encuentra entre los 1,500 y 3,000 mm anuales. Aquí habitan importantes especies maderables como la *Swietenia macrophylla* (caoba) y *Cedrela mexicana* (cedro rojo); sin embargo, su diversidad es poco aprovechable debido a la heterogeneidad de las especies, También es una fuente importante de otros productos, como látex, rizomas de camote de cerro (*Dioscorea* spp.) y hojas de palma (Rzedowski, 2006).
2. Bosque tropical subcaducifolio: Presenta características similares entre el bosque tropical caducifolio y perennifolio, su nombre indica que sólo la mitad de los árboles presentes dejan caer sus hojas. Su distribución abarca más superficie en la vertiente del Pacífico que del Atlántico, se presenta en forma

de manchones desde el centro de Sinaloa hasta la zona costera de Chiapas, depresión central y península de Yucatán, abarca el 4% de nuestro territorio y se encuentra en alturas entre los 0 y 1,300 msnm, con temperaturas entre los 0 y 28 °C. Representa una riqueza forestal considerable. Habitan especies como *Cordia alliodora*, *C. elaeagnoides*, *Tabebuia rosea*, *Tabebuia palmeri*, entre otras.

3. Bosque tropical caducifolio: La mayoría de los árboles pierden sus hojas en época de sequía, que abarca un periodo de 6 meses. Cubre grandes extensiones, cerca del 8 % del territorio. Se encuentra en altitudes de 0 a 1,900 msnm y alcanza temperaturas hasta los 29 °C. La explotación forestal es escasa (Rzedowski, 1981). Se presentan especies como *Cordia elaeagnoides*, *Bursera spp.*, *Cyrtocarpa procera*, *Ceiba aesculifolia*, entre otras.

2.2 Utilidad de los bosques: Efectos de la deforestación.

Los bosques generan una amplia gama de servicios al planeta, no sólo económicos o sociales, sino también biológicos y ambientales como son la conservación de la biodiversidad, equilibrio de los ecosistemas, absorción de carbono para controlar los gases de efecto invernadero, además de capturar agua y evitar la erosión de los suelos; por lo tanto nos permite eficientar los sistemas agrícolas y ganaderos, mejorar nuestras condiciones de vida, tanto en la calidad del ambiente como de los paisajes, haciéndolos más recreativos y agradables. Tiene otros usos indirectos como son la extracción de plantas medicinales y curativas, productos para la alimentación como pueden ser flores, frutos, raíces y hojas, productos útiles para la construcción o el hogar, combustible y extracción de productos no maderables como resinas, chicle, etc. (Morán, 2002).

La merma de la cubierta vegetal provoca una mayor exposición a la interperización de los suelos por lo que provoca la desertificación, lo que a su vez ocasiona la disminución de la productividad del suelo y la reducción del potencial biológico. Actualmente, más de 3,500 millones de ha, distribuidas en 100 países, son afectadas por diversos procesos de desertificación.

La deforestación y la agricultura intensiva sólo resulta en cambios atmosféricos graduales, pero constantes, que a la larga se comienzan a reflejar en alteraciones climáticas, excesivas precipitaciones, prolongados periodos de sequía, fenómenos naturales devastadores, etc. (Martínez y Fernández, 2004).

2.3 Situación de los bosques en el mundo.

De acuerdo con reportes de la FAO efectuados en el 2001, se indica que el 30 % de la superficie del mundo estaba cubierta de bosques, sin embargo durante la década de 1990 a 2000 se registró una baja de 9.4 millones de ha (Ladrach, 2005).

América Latina y el Caribe cuentan con el 22 % de la superficie forestal mundial. La pérdida boscosa en esta zona ha ido en aumento pues va del 0.46 % en 1990 al 0.51 % durante el periodo 2000-2005, lo que equivale a 64 millones de ha durante este periodo (Fig. 1). Las tendencias indican que siguen a la baja los bosques en Sur y Centro de América, mientras que se registró un ligero aumento de la superficie forestal en Chile, Costa Rica, Cuba y Uruguay (FAO, 2007).

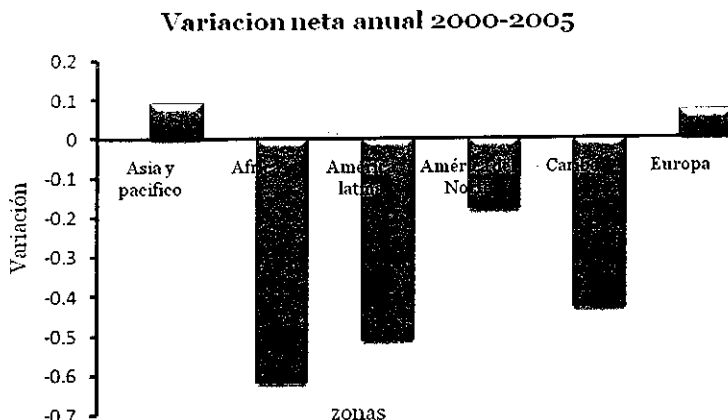


Figura 1: Variación neta anual de la superficie forestal mundial 2000-2005 (FAO, 2007).

2.3.1 La situación de los bosques en México.

De acuerdo a los análisis de la FAO (2005), México perdió aproximadamente 29,765 km² de bosque de 1976 a 1993, mientras que de 1993 a 2000 se perdieron 54,306 km². Por lo tanto se registra un aumento en la pérdida de superficie forestal de 175,000 ha a 319,000 ha anuales durante el segundo periodo.

Las causas de la deforestación tanto en México como en el mundo son diversas, entre las más importantes destaca el avance de las tierras agrícolas y ganaderas, dando como resultado un gran costo por la pérdida de los ecosistemas perturbados y la poca productividad de estas tierras que a la larga terminan siendo abandonadas.

El desarrollo de infraestructura ha ocasionado una tasa importante de deforestación, la construcción de carreteras, instalaciones eléctricas, presas, minas y desarrollos turísticos; asimismo, provocó el detrimento de grandes extensiones de bosque y selva, logrando no sólo la pérdida de hábitat, sino la fragmentación de los mismos, además de ocasionar problemas subsecuentes como el acceso a la colonización, lo que provoca posteriormente más disturbio. También se incluyen dentro de las causas, la extracción de madera para fines de aprovechamiento humano, ya sea para muebles, combustible o subproductos de la madera como gomas o celulosa (WWF, 2008).

El aprovechamiento forestal ha tomado más conciencia sobre el manejo sustentable de los bosques; sin embargo, los que son explotados bajo criterios ambientales son muy pocos, por el contrario la extracción de madera ilegal es una práctica común.

Otras de las causas que afectan la vegetación forestal puede ser: la extracción de madera para la obtención de leña y carbón, también, la contaminación atmosférica que provoca un debilitamiento de las especies arbóreas y por lo tanto una mayor susceptibilidad a plagas y enfermedades, así como los incendios, tanto originados por la sequía como los generados de manera premeditada para obligar el desarrollo urbano o con la finalidad de

generar más espacios para la agricultura o ganadería (WWF, 2008).

Cordia elaeagnoides también conocida como barcino se encuentra dentro de los miles de hectáreas perdidas de bosques deforestados, a su vez, la extracción para la obtención de madera ha provocado un detrimento en las poblaciones naturales de barcino, aunque no existe una cifra para corroborar su extracción, si se ha reportado su escasez cada vez mayor, incluso se ha sugerido la utilización de especies alternas como *Lysiloma acapulcensis* y *L. microphyllum* para contrarrestar la sobreexplotación y así permitir la recuperación de las poblaciones naturales del barcino (Pérez, 1993).

2.4 Descripción botánica.

2.4.1 Familia: Boraginaceae.

Es una familia que esta constituida por hierbas, lianas, arbustos y árboles, organizados en 100 géneros y 2,000 especies. Generan frutos en forma de drupas o nuececillas, los principales géneros son: *Cordia*, *Amsinkia*, *Bouyeria*, *Coldenia*, *Halgania*, *Westedia*, entre otras (Niembro, 1989). Presentan hojas simples alternas y raramente opuestas, con flores bisexuales, actinomorfas, pentámeras y organizadas en cimas. Su cáliz tiene 5 sépalos soldados, igualmente la corola, 5 estambres libres, ovario súpero, con dos carpelos y de 2 a 4 cavidades.

Su distribución es principalmente en los trópicos. Incluye especies con importancia medicinal y ornamental como *Cordia bouissiera*, *Borago officinalis* y *Myosotis scorpioides* (Villareal ,1993).

2.4.2 *Cordia elaeagnoides* A. DC. (Boraginaceae).

Nombre común: Ocotillo (Oax); bocote, bojote, cueramo (Mich., Gro., Oax.); grataña, gresiño(Chis.); barcino (Jal.).

Descripción: Es un árbol que puede alcanzar hasta los 20 m y un diámetro de 30 cm, tronco recto con ramas gruesas y horizontales. Corteza externa fisurada con las costillas escamosas y suberificadas, pardo grisácea. Interna de color crema amarillento, que cambia a pardo, grosor de la corteza 13 mm. Las hojas están dispuestas en espiral, simples con láminas de 6.5 x 3.0 cm hasta 14.0 x 6.5 cm, ovadas o con el margen entero, ápice acuminado, verde oscuro en el haz con pelos adpresos o glabra, grisáceas en el envés con abundantes pelos adpresos y nervaduras prominentes (Pennington y Sarukhán, 1998; Barajas-Morales, 1989).

Las flores son amplias panículas axilares o terminales de 10 a 20 cm de largo, grises, pubescentes, actinomorfas, cáliz campanulado, corola blanca y tubular en la parte interna, ovario súpero, 4 locular, 4 estigmas truncados y papilosos. Florece de septiembre a diciembre.

Los frutos son nuececillas con toda las partes florales persistentes, los pétalos se convierten en alas papiráceas de hasta 2.8 cm de diámetro, cada fruto contiene 4 semillas (Niembro, 1989).

Madera: Albura color café claro y el duramen color café oscuro a negruzco con poco lustre, esta característica veteadas le da una coloración elegante (Fig. 3a) (León, 1985). Anillos de crecimiento marcados por fibras. Los poros son fácilmente visibles, igualmente los rayos, algunos vasos del duramen se encuentran taponados con gomas (Barajas-Morales, 1981).

Distribución: Es un componente endémico del bosque tropical caducifolio y subcaducifolio de México, habitando en las partes expuestas de las laderas lomas, sobre suelos someros de origen volcánico, metamórfico y calizo. Se distribuye exclusivamente en la vertiente del Pacífico desde Jalisco hasta Oaxaca y Chiapas incluyendo la cuenca del Río Balsas (Fig.2) (Pennington y Sarukhán, 1998).



Figura 2: Distribución de *Cordia elaeagnoides* (Pennington y Sarukhán, 2005).

Usos: Es cultivada principalmente para muebles y construcciones rurales así como por la fragancia de sus flores (León, 1985; Niembro, 1986), es utilizado como combustible o como especie ornamental (Pennington y Sarukhán, 1998). También se usa para elaborar artesanías de tornería, incluso piezas pequeñas para accesorios personales como pulseras, collares y aretes (Barajas-Morales, 1989; Pérez, 1993). En Michoacán es utilizada como especie forrajera (González y col., 2006).

Cordia elaeagnoides es una especie poco estudiada con respecto a sus características medicinales; sin embargo, se conocen capacidades antibacteriales y antifúngicas para otras especies del género *Cordia* (Hernández y col., 2003). Además se ha demostrado su resistencia natural al ataque de los hongos (Lomelí, 1991).

2.5 Propagación de plantas.

2.5.1 Propagación sexual.

La propagación de los vegetales se puede dividir en dos grandes grupos: Propagación sexual y asexual. La propagación sexual se inicia cuando el microgametofito es liberado como el grano de polen; el megagametofito o saco embrionario es retenido en el esporofito como parte del rudimento seminal. Cuando el polen se deposita en un estigma receptivo y compatible este germina formando el tubo polínico. Una célula espermática fertiliza a la célula huevo y forman el cigoto que da origen al embrión y posteriormente a la semilla a partir del rudimento seminal. (Flores-Vindas, 1999). Las semillas debido a su origen tienen una mayor variabilidad genética debido al entrecruzamiento que se genera entre la célula espermática y la célula huevo, por lo que generan poblaciones heterogéneas. Un sin número de especies son propagadas vía sexual; sin embargo, existen especies que por problemas fisiológicos o anatómicos el sistema de propagación sexual resulta no ser tan eficiente. Uno de los problemas más comunes en la propagación por semilla es el rompimiento del periodo de latencia; sin embargo, las razones por la que la semilla se encuentra en este proceso son innumerables, todo depende del tipo de latencia que esté presentando. Los tipos se clasifican como a continuación se describe:

1. Latencia exógena:

- **Latencia física:** Consiste en el endurecimiento parcial o total de las cubiertas seminales lo que provoca una impermeabilidad, por lo tanto el embrión permanece quiescente dentro de una cubierta impermeable.
- **Latencia mecánica:** El endurecimiento de la testa no permite que el embrión se expanda durante la germinación.
- **Latencia química:** Corresponde a la acumulación de sustancias como el ácido abscísico (ABA), el cual inhibe la germinación, ya sea en el fruto o en la cubierta seminal.

2. Latencia morfológica:

El desarrollo del embrión no ha llegado a su término, por lo que se puede generar un embrión rudimentario o uno no desarrollado, en el primer caso, el embrión es poco menos que un proembrión embebido en el endospermo, para el segundo caso, la madurez del fruto tiene embriones poco desarrollados con forma de torpedo. El crecimiento posterior del embrión se efectúa antes de la germinación (Willan, 1991).

3. Latencia interna:

En el control interno de la germinación están implicados procesos separados. El primero es el control ejercido por semipermeabilidad de la cubierta seminal y el segundo es el proceso de letargo que presenta el embrión y puede romperse con temperaturas bajas y humedad.

- Fisiológica: La germinación es impedida por un mecanismo fisiológico inhibitor.
- Interno intermedio: Inducida principalmente por la cubierta de la semilla y los tejidos de almacenamiento que rodean al embrión.
- Del embrión: Se caracteriza porque se requiere un periodo de enfriamiento y humedad para lograr la germinación.

4. Latencia morfofisiológica:

Consiste en la combinación del subdesarrollo del embrión con mecanismos fisiológicos inhibidores fuertes.

5. Latencia combinada exógena-endógena:

Se presenta latencia de la cubierta o el pericarpio con latencia fisiológica endógena (Willan, 1991).

Para contrarrestar las dificultades en la germinación existen diferentes técnicas como la manipulación de la temperatura, escarificación, estratificación o la adición de sustancias reguladoras del crecimiento como al ácido giberélico, el cual actúa sobre los sistemas de enzimas que a su vez operan sobre el almidón, las proteínas y los ácidos nucleicos, los cuales son transformados a una forma asimilable para el crecimiento de la planta (Harold y Hocker, 1984).

2.5.2 Propagación asexual.

Se toma como una alternativa eficiente, sobre todo cuando se desea conservar las características de la planta madre y cuando existen obstáculos en el proceso de reproducción sexual, que vuelven ineficiente la propagación masiva para determinada especie.

La reproducción asexual se basa en la utilización de partes vegetativas de una planta madre para generar individuos idénticos o clones, esto sucede con base en el principio de totipotencia, el cual consiste en la capacidad de las células somáticas de generar un individuo completo (Sonsire, 1994). La ventaja de este método radica en la selección de características genotípicas deseables y la preservación de las mismas, por lo tanto la obtención de poblaciones homogéneas y con mayor productividad. Existen diferentes métodos de propagación asexual como las estacas, acodos o injertos. Las hojas también pueden utilizarse en algunas especies para regenerar raíces y tallos.

2.5.3 El cultivo *in vitro*.

También se considera dentro de la propagación asexual de los vegetales, sus comienzos datan de hace 120 años, comenzando con los estudios de fisiología vegetal. Esta técnica consiste en el cultivo en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica de ápices de raíces, tallos, primordios de hoja, brotes, partes inmaduras de flores y frutos, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos, entre otros. Los primeros intentos en esta técnica fueron realizados por Sacks (1860) y Knops (1861), citados por Hurtado y Merino (1988), quienes observaron que los principales nutrientes de las plantas eran inorgánicos y prepararon una solución que los contenía, la cual ha sido utilizada por muchos investigadores desde entonces. En los años posteriores las investigaciones fueron desarrollándose, probando con diferentes especies y órganos vegetales. Fue en 1952 cuando Moret y Martín lograron obtener plantas libres de virus por medio de la extracción del meristemo apical de la Dahlia, y hasta 1962 cuando Murashige y Skoog desarrollaron un medio

nutritivo con investigaciones en tabaco, el cual hasta la fecha es el más usado por su amplio espectro de especies cultivadas. Los años siguientes se estudió la producción de haploides (por medio del cultivo de anteras), además de la fusión de protoplastos y la producción de alcaloides en cultivos en suspensión y síntesis de metabolitos secundarios, mutagénesis y fitomejoramiento, formando así las bases para el cultivo de tejidos vegetales (Hurtado y Merino,1988).

Para la propagación vegetativa de forestales, se conocen y utilizan dos sistemas: el sistema “producción en masa” y el sistema de “clonación”. El primero multiplica una variedad importante de genotipos para posteriormente convertirlos en un huerto para la recolección de semillas o para la producción de madera, este sistema es utilizado en el caso del cedro amarillo (*Chamaecyparis nootkatensis*) en Alaska y una especie mejorada de *Picea abies*. El segundo realiza miles de copias de un solo genotipo parental con características previamente seleccionadas. El éxito de cada sistema está muy ligado a la especie y al objetivo que se busca; sin embargo, la clonación ofrece una mejor alternativa comercial debido a que la selección clonal lleva una máxima ganancia genética (Sonsire, 1994).

2.6 Fisiología en el cultivo *in vitro*.

A partir de la germinación de la semilla las células que la conforman comienzan a tomar una mayor complejidad. Desde que es una célula y ésta comienza a realizar divisiones sucesivas, las cuales le van otorgando una diferenciación que le permite generar tejidos mas especializados. Las plantas por el contrario de los animales, poseen un gran número de células indiferenciadas o embrionarias dispersas entre las células somáticas que conforman los tejidos. Las células retienen muchas características que las aproximan en su fisiología y más aún a su potencialidad fisiológica, a las de un embrión. A esta capacidad celular se les llama totipotencia. De esta capacidad de las plantas surgen técnicas de cultivo *in vitro* como la embriogénesis y organogénesis.

El crecimiento depende estrechamente de la energía liberada durante la respiración, donde se realizan una serie de cambios termoquímicos que permiten el aumento celular, por lo que el factor de la temperatura está fuertemente ligado al crecimiento. La luz es otro factor importante para el desarrollo debido a que va de la mano con los procesos fotosintéticos.

El crecimiento tiene sus propias leyes y reguladores hormonales. Las hormonas son un factor estimulante del desarrollo, son intermediarios entre el estímulo (luz o temperatura) y la respuesta de la planta (germinación, floración, etc.). Las hormonas actúan sobre los ácidos nucleicos para reprimir o permitir la expresión de determinados genes al nivel de la transcripción o de la transducción. Estas hormonas se clasifican en cuatro grupos: auxinas, giberelinas, citocininas y etileno (Rojas y Rovalo, 1985). Las auxinas se sintetizan en el meristemo apical y son transportadas por el floema a las células basales, su efecto radica en la estimulación de la elongación celular en los coleóptilos y en otras zonas del brote, estimula la elongación de raíces y acelera la respiración, intensificando el metabolismo a bajas concentraciones, además de estimular las ramificaciones de las raíces. Las citocininas promueven la división celular, en consecuencia estimulan las yemas, frutos; también permiten retrasar el envejecimiento en ciertas partes de la planta (Audesirk y Audesirk, 1996). Las giberelinas promueven el alargamiento de los tallos, sus efectos pueden ser variados de acuerdo a la especie, pueden favorecer la floración, el desarrollo del fruto, la germinación de las semillas o el desarrollo de yemas (Pimienta y col., 2006). El etileno es una hormona que puede ser sintetizada en diferentes partes de la planta, así como también en diferentes concentraciones de acuerdo al estadio de desarrollo, participa en el crecimiento y diferenciación de las plantas como la germinación, maduración de los frutos, señalización de la muerte celular y variación en los índices de crecimiento. En el cultivo *in vitro* el etileno puede tener un efecto benéfico o por lo contrario puede ser inhibidor dependiendo de la especie. Algunos reguladores pueden influir en la síntesis del etileno, tales como: citocininas, ácido abscísico, auxinas, metil-jasmonatos,

brasinoesteroides y poliaminas. Se conocen inhibidores de la ACC sintetasa (ácido-1-aminociclopropanocarboxílico), tales como el aminoethoxy-vinyl-glycina (AVG) y el ácido amino-oxycético (AOA), los cuales reducen la producción de etileno. El nitrato de plata (AgNO_3) actúa como protector ante la acción del etileno y las poliaminas, combaten el estrés producido por dicha hormona (George. 1993; Pimienta y col., 2006; Nieves y col., 2007).

Los compuestos fenólicos son sustancias producto del metabolismo secundario de las plantas, su concentración dentro de los tejidos depende de la edad ontogenética; algunos de estos compuestos pueden ser indispensables para funciones fisiológicas y otros son de utilidad ante situaciones de estrés. Ejemplo de estos compuestos son los taninos y flavonoides (Concepción, 2005).

En el cultivo *in vitro* la acumulación de compuestos fenólicos puede dar como resultado la inhibición del crecimiento de la planta. El carbón activado puede adsorber inhibidores fenólicos; sin embargo, tiene que ser utilizado cuidadosamente, pues también puede adsorber reguladores de crecimiento u otros componentes del medio. Se recomienda utilizarlo en concentraciones de 0.45 a 3 g/L (George, 1993).

La efectividad del cultivo *in vitro* se basa en el conocimiento de todos estos procesos y la manipulación de los mismos, la aplicación de reguladores de crecimiento que vienen a suplir la síntesis de fitohormonas, la manipulación de la luz y la temperatura ayudan a controlar el crecimiento. La adición de sustancias como el carbón activado, el nitrato de plata o el ácido cítrico, entre otros, permite controlar la acumulación de gases o la oxidación de los tejidos otros suplementos como aminoácidos permiten buscar el óptimo desarrollo del cultivo establecido (George, 1993).

2.6.1 Cultivo *in vitro* en especies forestales.

La micropropagación se ha vuelto la base de la industria comercial de plantas; actualmente se encuentran involucrados cientos de laboratorios alrededor del mundo, por ejemplo en Holanda existen de 65 a 70 laboratorios, que se encargaron de producir alrededor de 53 millones de plantas durante principios de los 90's (FAO, 1994). El uso de las técnicas de cultivo *in vitro* permite una multiplicación rápida, además de dar muy buenos resultados en especies con dificultad en su propagación por otras vías. Existen diferentes métodos para la propagación masiva en laboratorio, una de ellas es el cultivo de yemas axilares el cual ha tenido logros significativos con el cultivo de especies forestales especialmente el eucalipto y especies del género *Pinus*. Otra especie cultivada por esta vía es la *Swietenia macrophylla* (caoba) la cual en 2004 fue sujeta a estudio para su propagación por yemas axilares, las cuales fueron cultivadas en medio de cultivo Murashige y Skoog a la mitad de su concentración adicionada con diferentes combinaciones de ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA), dando como resultado que las concentraciones 0 y 1.5 mg/L, respectivamente, eran las que generaban una respuesta más satisfactoria (Tacoronte y col., 2004).

Otra de las técnicas y de las más utilizadas para el cultivo de especies forestales es la organogénesis indirecta; sin embargo, esta ruta es mucho más larga que la del método anterior, pues se tiene que inducir la formación de callo, este sistema fue descrito en álamo (*Populus* spp.) y en pino de California (*Pinus radiata*). Esta técnica al igual que todas las que se manejan en el cultivo de tejidos, es más recomendable y productivo, la utilización de material vegetal joven, en el caso de las coníferas, es donde se ha dado buenos resultados con la utilización de embriones (FAO, 1994).

La embriogénesis somática es una técnica en la cual a una célula somática se le induce el comportamiento de una célula cigótica es decir se induce a generar un embrión somático y éste a su vez una planta completa. De las técnicas antes mencionadas, es la que tiene menos éxito en las especies

forestales; sin embargo, se ha reportado en 50 especies leñosas, 20 del grupo de las angiospermas como especies de los géneros *Picea*, *Pinus*, *Abies*, *Sequoia* y *Eucalyptus*. Esta técnica es muy productiva, especialmente en células en suspensión pues en el género *Picea* se lograron reportar 100 embriones por cada mililitro de medio de cultivo (FAO, 1994).

Con respecto a *Cordia elaeagnoides*, existen pocos reportes sobre su cultivo *in vitro*, Regla (2007) realizó el intento de establecimiento y la germinación de semillas *in vitro*, donde evaluó con diferentes técnicas de desinfección (temperaturas ambiente y a 70 °C, periodos de inmersión en hipoclorito de sodio al 1.8 % por 7 min) y adición de ácido giberélico (420 mg/100 mL inmerso durante cero y 24 h), desgraciadamente las pruebas no arrojaron resultados positivos.

La especie mas estudiada en el cultivo *in vitro* del género *Cordia*, es *Cordia alliodora*, Schuler y col. (2005) probaron con brotes extraídos de semillas germinadas, establecidos en medios de cultivo Murashige y Skoog a la mitad de su concentración, adicionado con ácido cítrico y ascórbico, después de los 30 d del establecimiento fueron transferidos para su multiplicación en medios de cultivo MS al 50 %, adicionado con 0.47 μM de ácido giberélico y 6.04 μM de cinetina, reportó con estos experimentos que es una especie recalcitrante para el cultivo *in vitro* debido a que presenta una tasa baja de multiplicación y una alta tasa de pérdida.

2.7 Silvicultura clonal.

La silvicultura clonal consiste en la utilización de propágulos vegetales generados a partir de una misma planta madre, en los cuales no existe variabilidad genética alguna. Actualmente es utilizado en álamos, sauces, eucaliptos y pinos. Las ventajas que otorga este método radican en la obtención de individuos genéticamente iguales, los cuales cuentan con características deseables previamente seleccionadas, y la perpetuación de los mismos, lo que permite tener una mejor calidad, uniformidad y productividad de la plantación. Entre sus desventajas se encuentra el detrimento de la variabilidad genética, lo que los vuelve más susceptibles a variantes climáticas inesperadas, plagas y enfermedades que pueden provocar incluso la pérdida total del cultivo sino se les da un manejo adecuado. Para enfrentar estos problemas existen varias técnicas que permiten contrarrestar el efecto de la poca variabilidad genética, entre estas técnicas se encuentran: retroalimentar la población con nuevas fuentes de variación, es decir una vez explotada la población clonal no avanzar en la selección en ésta, si no obtener nuevos individuos no emparentados con la generación anterior. Clonar especies de amplia adaptabilidad nos permite tener un mayor rango de temperatura, humedad y otros factores abióticos que sigan siendo de confort para la especie seleccionada. La utilización de grupos monoclonales, es decir utilizar grupos clonales de orígenes genéticos no emparentados para imprimir variabilidad a la plantación, ha resultado ser una estrategia eficiente para plantaciones comerciales que van hasta las 5000 ha por año (Carpineti, 2004).

Las técnicas de cultivo *in vitro* como el cultivo de nudos, yemas y meristemos, además de la organogénesis, se han vuelto técnicas muy eficientes en la generación de plantas madre para la producción de estacas para enraizar, o simplemente se ha vuelto en una manera productiva para una propagación masiva de clones (Carpineti, 2004). Estas técnicas junto con el manejo de silvicultura clonal, ha permitido una regeneración más rápida de los bosques, aunque aún no ha podido alcanzar la velocidad de la deforestación global.

3. JUSTIFICACIÓN

Las actividades humanas poco sustentables ocasionan cada día nuevas problemáticas a nivel global, el cambio climático, los desastres naturales y la desertificación, son algunos de los problemas generados por la tala excesiva de los bosques, además del poco interés y trabajos que se realizan para la recuperación de los mismos. *Cordia elaeagnoides* no ha sido la excepción dentro de las especies afectadas por la tala inmoderada, pues debido al constante saqueo de zonas naturales para su aprovechamiento, se ha convertido en una especie cada vez más escasa dentro de su hábitat. La elección de especies adecuadas permite no sólo lograr una reforestación y apoyar a la expansión de los bosques, sino también con un manejo adecuado obtener un mayor beneficio económico. En tal caso *C. elaeagnoides* resulta ser una especie adecuada para plantaciones comerciales para el aprovechamiento de su madera, hojas y flores. Se han reportado en diversas especies del género *Cordia*, el fenómeno de autoincompatibilidad (Taisma y Wolfgang, 2005) y problemas con el rompimiento de latencia en las semillas, por lo que se requieren métodos alternativos para llevar a cabo la multiplicación masiva de la especie, con la finalidad futura de establecerlos en plantaciones comerciales, logrando así disminuir presión a los bosques naturales y a otras especies sumamente explotadas.

La propagación *in vitro* es una opción debido a que presenta ventajas como son: los pequeños espacios que se necesitan para cultivar grandes cantidades de plantas, se puede realizar en cualquier época del año y tipo de clima, así como la obtención de plantas libres de patógenos.

4. HIPÓTESIS

Las técnicas de propagación asexual resultan ser eficientes para la multiplicación del árbol tropical maderable *Cordia elaeagnoides* A.DC. (Boraginaceae).

5. OBJETIVOS

Objetivo general: Desarrollar un protocolo eficiente para la propagación asexual de *Cordia elaeagnoides*.

Objetivos particulares.

Aplicar diferentes concentraciones y tipos de citocininas para la inducción de brotes *in vitro* de *C. elaeagnoides*.

Evaluar el empleo de diferentes medios de cultivo buscando el óptimo desarrollo de los brotes de *Cordia elaeagnoides*.

Probar el método de etiolación para la elongación de tallos, así como para la inducción de rizogénesis *in vitro*.

Desarrollar experimentos para la evaluación de diferentes concentraciones de ácido indol-3butírico para la estimulación de raíces.

Evaluar el efecto de diferentes sustratos y enraizadores para el enraizamiento de estacas de barcino en invernadero.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Rescate de embriones y propagación masiva de *Cordia elaeagnoides*.

Se utilizaron semillas de *Cordia elaeagnoides* A.DC. (Boraginaceae) (Previamente secadas) colectadas en Tomatlán, Jalisco.

Para llevar a cabo la técnica de rescate de embriones, las semillas fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % por un periodo de 10 min. Se enjuagaron con agua estéril y fueron dejadas en remojo por 24 h. Para la extracción del embrión fue necesario el uso de un estereoscopio, se eliminó la testa y se extrajo el embrión, el cual se sembró en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) adicionado con 2 mg/L de benciladenina (BA), gelificado con 8 g/L de agar, se incubaron a 27 ± 2 °C con una intensidad lumínica de 1500 lux y un fotoperíodo de 16 h, se mantuvieron por un periodo de 2 meses para su multiplicación, durante las cuales se realizaron varias transferencias a medio de cultivo nuevo para evitar el agotamiento del mismo y la acumulación de etileno.

6.2 Proliferación de yemas axilares en brotes de *Cordia elaeagnoides* *in vitro*.

Una vez obtenidos los brotes requeridos, se desarrolló un experimento multifactorial 3x3x2 para inducir la proliferación de brotes axilares con las citocininas 2-isopentiladenina (2ip), benciladenina (BA) y cinétina (Kin), cada una con tres concentraciones (1, 2 y 3 mg/L), además se probaron dos diferentes medios basales MS (Murashige y Skoog, 1962) y McCown's (McCown y Lloyd, 1981). Cada tratamiento contó con cinco repeticiones, tomando como unidad experimental un frasco con 25 mL del medio de cultivo correspondiente con un brote establecido conteniendo dos a tres nudos. Se incubaron a 27 ± 2 °C con una intensidad lumínica de 1500 lux y un fotoperíodo de 16 h, realizando observaciones quincenales por un periodo de 45 d donde se evaluó el número de brotes generados por explante.

6.3 Control de oxidación *in vitro* de explantes de *Cordia elaeagnoides*.

Se realizó un experimento en el que se probaron productos como el nitrato de plata (1 mg/L), carbón activado (3 g/L) y una solución estéril de ácido cítrico y ácido ascórbico (200 mg/L c/u) para la inmersión de los tejidos; en la búsqueda de eliminar la oxidación (George, 1993; Schuler y col., 2005). Se establecieron un total de ocho tratamientos (Cuadro 1), y se utilizó el medio MS a la mitad de concentración; cada tratamiento contó con cinco repeticiones y como unidad experimental un frasco adicionado con 25 mL de medio y un brote conteniendo entre dos y tres nudos. Fueron incubados bajo las mismas condiciones que los experimentos anteriores por un período de 45 d, realizando observaciones quincenales, en donde se evaluó la calidad del brote con respecto al porcentaje de tejido perdido por la oxidación.

Cuadro 1. Tratamientos para el control de oxidación en explantes de *Cordia elaeagnoides*.

Tratamiento	Nitrato de plata	Carbón activado	Ac. cítrico/ascórbico
1	1 mg/L	3 g/L	200 mg/L / 200 mg/L
2	1 mg/L	3 g/L	0
3	1 mg/L	0	200 mg/L / 200 mg/L
4	1 mg/L	0	0
5	0	3 g/L	200 mg/L / 200 mg/L
6	0	3 g/L	0
7	0	0	200 mg/L / 200 mg/L
8	0	0	0

6.4 Inducción de rizogénesis y elongación de tallos.

Se estableció un experimento trifactorial 3x2x2 (Cuadro 2), donde el primer factor fue la utilización de ácido indol-3butírico en tres diferentes concentraciones (0, 2.5 y 5 mg/L), el segundo factor radica en la presencia o ausencia de adenina (40 mg/L) y en el tercero se probó la intensidad lumínica de 1500 lux y oscuridad. El medio utilizado fue McCown's, gelificado con 3 g/L de Phytigel®; y para evitar la oxidación de los tejidos se adicionó al medio 1 mg/L de nitrato de plata, 3 g/L de carbón activado y se realizaron previo al establecimiento *in vitro* inmersiones en una solución de ácido cítrico y ascórbico (200 mg/L de c/u). Cada tratamiento contó con cinco repeticiones, tomando como unidad experimental un frasco adicionado con 25 mL de medio conteniendo un brote con dos a tres nudos. Para los tratamientos que requerían de oscuridad se cubrieron completamente con papel aluminio. Fueron incubados bajo las mismas condiciones que los experimentos anteriores por un período de 45 d, se efectuaron evaluaciones quincenales como variables se tomaron el número de raíces presentes, así como brotes generados por explante.

Con la finalidad de evaluar los efectos del etileno sobre el enraizamiento se estableció a la par un experimento con las mismas características que el anterior, solamente se excluyeron los agentes antioxidantes, es decir, no fue adicionado el nitrato de plata, carbón activado ni se realizaron baños en la solución de ácido cítrico y ascórbico. Se incubaron bajo las mismas condiciones que los experimentos anteriores por un periodo de 45 d, realizando muestreos quincenales a tres de las cinco repeticiones por tratamiento, tomando como variables el número de raíces presentes y largo del brote.

Cuadro 2: Tratamientos para la inducción de raíces.

Tratamiento	Luz	Adenina	Regulador
1	1500 lux	40 mg/L	0
2	1500 lux	40 mg/L	2.5 mg/L IBA
3	1500 lux	40 mg/L	5.0 mg/L IBA
4	1500 lux	0	0
5	1500 lux	0	2.5 mg/L IBA
6	1500 lux	0	5.0mg/L IBA
7	0	40 mg/L	0
8	0	40 mg/L	2.5 mg/L IBA
9	0	40 mg/L	5.0 mg/L IBA
10	0	0	0
11	0	0	2.5 mg/L IBA
12	0	0	5.0 mg/L IBA

6.5 Establecimiento de estacas de *Cordia elaeagnoides* en invernadero.

6.5.1 Establecimiento de estacas de *Cordia elaeagnoides*: Pruebas con enraizadores y sustratos.

Se estableció un experimento multifactorial 3x5x2, donde el primer factor era el tipo de sustrato utilizando: jal, agrolita y una combinación de agrolita y peat-moss en relación 70:30, el factor dos consistió en la utilización de cuatro tipos de enraizadores (Radix 10,000®, Dip´N grow®, Root-gel® Rootech® mas un testigo sin aplicación), el tercer factor consistió en la presencia de la hoja superior o ausencia de hojas en la estaca.

Las estacas fueron establecidas y colocadas en invernadero a una temperatura entre 25 y 30 °C y una humedad entre 65 y 85% por un período de 45 d. (Fig. 4c). Se evaluó el número de raíces así como la longitud de las mismas.

6.5.2 Establecimiento de estacas de *Cordia elaeagnoides*: Pruebas con tapete térmico.

Se estableció un experimento en sustrato peat-moss mas agrolita en una proporción 60:40, las estacas fueron humedecidas con enraizador líquido Dip´N grow® Se establecieron un total de 30 repeticiones repartidas en dos charolas conteniendo cada una un total de 15 estacas. En una charola se utilizó un tapete térmico que mantenía la temperatura en el sustrato a 30 °C durante la noche (19:00 a 8:00 h); en la otra no se utilizó el tapete. Ambas charolas fueron colocadas bajo las mismas condiciones del experimento anterior y cubiertas con una tapa plástica para conservar el calor y la humedad. Para este caso se evaluó la eficacia del tapete térmico en la producción de raíces de la estaca (Fig 4e).

Las variables medidas fueron el número de raíces y la longitud de las mismas.

6.6 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de todos los experimentos se utilizó el software Statgraphics Plus 4.0 ®. Se realizaron análisis de varianza para los diferentes experimentos donde se evaluaron las variables de respuesta correspondientes, además de comparación múltiple de medias mediante la prueba de diferencias mínimas significativas (LSD).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Rescate de embriones y propagación masiva de *Cordia elaeagnoides*.

Los resultados obtenidos de esta técnica fueron muy satisfactorios, del total de los embriones rescatados se obtuvo un 82 % de germinación. A los 2 d posteriores al establecimiento, se inició el proceso de germinación con el despliegue de los cotiledones (Fig. 3b). Después de 7 d de iniciado el cultivo, el desarrollo de la planta era óptimo, incluso presentaron indicios radiculares (Fig. 3c). A los 30 d los problemas oxidativos comenzaron a presentarse en la mayoría de las plantas desarrolladas (Fig. 2d). La técnica de rescate de embriones ha sido utilizada anteriormente en especies como *Persea americana* Mill, dicha técnica fue utilizada exitosamente en un programa para la multiplicación vegetativa con la finalidad de llevar a cabo mejoramiento genético, los embriones tanto maduros e inmaduros fueron extraídos y cultivados en medio MS a la mitad de su concentración adicionado con 0.5 mg/L de 6-bencil amino purina y la misma cantidad de ácido giberélico (Rodríguez y col., 1999). *Pinus maximartinezii* Rzedowski también ha sido utilizado para su multiplicación a partir del rescate de embriones, con la finalidad de conservar y expandir la presencia de los bosques de esta especie en peligro de extinción (Ojeda y col., 2006).

Regla (2007) realizó investigaciones para la germinación de *C. elaeagnoides in vitro*, colocando la semilla tratadas con ácido giberélico y bajo diferentes tratamientos de desinfección por calor sobre medio MS, reportando una tasa nula de germinación, además de tener un alto porcentaje de problemas de contaminación y oxidación del medio de cultivo. A su vez realizó experimentos con brotes extraídos de plantas madres, sin embargo, reportó un alto índice de senescencia prematura de los tejidos.

Los resultados obtenidos por Regla (2007) hacen suponer la presencia de compuestos fenólicos en la cubierta de la semilla, los cuales al oxidar el medio de cultivo, inhiben el proceso de germinación. Gaspar (2008) realizó pruebas con semillas de barcino primero realizando un muestreo donde éstas fueron cortadas para observar la presencia de embriones, se constató que las semillas no eran abortivas. Posteriormente, realizó tinciones con cloruro 2, 3, 5-trifenil-tetrazolio (sal de tetrazolio al 1%), una prueba bioquímica que evalúa la viabilidad del embrión donde comprobó hasta el 100% de viabilidad de los embriones.

Al comprobar la viabilidad de las semillas así como la presencia de embriones sanos solo nos resta eliminar los compuestos fenólicos por medio del raspado de la testa, este método mecánico nos ayuda a evitar la oxidación del medio de cultivo así como eliminar dureza de la cubierta seminal; sin embargo, se pudo notar que a pesar de que la testa de la semilla fuera raspada casi en su totalidad aun así el proceso de germinación no se desencadenaba, por lo que se puede decir que la latencia física y presencia de compuestos fenólicos no es el único problema presente en las semillas de *C. elaeagnoides*. Estos resultados hacen suponer la presencia de sustancias inhibitoras de la germinación como pudiera ser el ácido abscísico (ABA), en la testa de la semilla. El ácido abscísico participa en la protección de la planta en casos de estrés: inhibe la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos, afecta las membranas y los niveles de otras hormonas, e induce la abscisión y senescencia. El ABA esta muy ligado a la inhibición de la germinación por medio del control de almacenamiento de proteínas de reserva (Pimienta y col., 2006), por lo tanto se recomienda un análisis sobre la concentración de ácido abscísico presente en las semilla de *Cordia elaeagnoides* que permita determinar, si esta es la razón que inhibe la germinación de éstas semillas. La adición de giberelinas para sustituir los periodos de frío requeridos para desencadenar la germinación, arroja resultados muy contradictorios desde favorecedores hasta no generar una respuesta, tal es el caso de *C. elaeagnoides* (Regla, 2007).

7.2 Proliferación de yemas axilares en brotes de *Cordia elaeagnoides*.

Después de transcurridos 45 d del establecimiento, se encontró que no se presentaba significancia para el tipo de medio ($p= 0.1714$), ni para la concentración del regulador ($p=0.0714$) en la producción de brotes, no siendo así para el tipo de regulador utilizado, donde se reportó una alta significancia ($p=0.0004$), esto ha sido mencionado por George (1993), donde explica que la adición de citocininas tiene un efecto represor de la dominancia apical, provocando la proliferación de brotes por medio de la estimulación de las yemas axilares.

Al realizar la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Diferencias Mínimas Significativas (LSD) se encontró que la mayor estimulación de brotes después de los 45 d la ejercían los tratamientos en presencia del regulador de crecimiento Kin y BA, presentando una mayor eficiencia de hasta 1,5 veces mayor que 2ip (Cuadro 3) (Fig. 3e). Con respecto a la concentración aunque en la prueba de análisis de varianza no se muestra una diferencia, se presenta cierta tendencia positiva al generar un mayor número de brotes y una menor oxidación de los tejidos cuando son utilizadas concentraciones mas bajas (1 mg/L). Se sugiere extender este experimento a un número mayor de repeticiones con la finalidad de observar esta tendencia.

Cuadro 3. Comparación múltiple de medias para el número de brotes de *Cordia elaeagnoides* estimuladas en diferentes reguladores de crecimiento a los 45 d.

Regulador		Repeticiones	Brotos/ concentración	Brotos promedio/regulador	Grupos homogéneos
zfp	1 mg/L	30	2.4	1.53	a
	2 mg/L		1.9		
	3 mg/L		1.7		
Khn	1 mg/L	30	3.6	3.03	b
	2 mg/L		3.4		
	3 mg/L		2.9		
BA	1 mg/L	30	3.6	3.03	b
	2 mg/L		3.0		
	3 mg/L		2.7		

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes $\alpha=0.05$ mediante la prueba LSD (Diferencias Mínimas Significativas).

La presencia de tejidos oxidados fue muy notoria conforme el transcurso del tiempo, sobre todo en aquellas que se encontraban en presencia de regulador zfp y en la mayor concentración 3 mg/L, además de generar callo pubescente en la parte basal (Fig. 3e).

La adición de reguladores de crecimiento para la inducción de brotes en *C. elaeagnoides* fue estrictamente necesaria, por el contrario a lo reportado por Tacoronte y col. (2004) quienes realizaron la propagación de *Swietenia macrophylla*, otra especie maderable tropical, por medio de yemas axilares, obteniendo que su mejor tratamiento era aquel que no contenía reguladores de crecimiento.

Aunque estadísticamente no se presentó significancia con respecto a los medios basales, originalmente los cultivos en el medio MS comenzaron a generar un mayor número de brotes, pero en los análisis posteriores, estos brotes fueron a la baja por el aumento en la oxidación, además de presentar un ligero amarillamiento. En el medio McCown's por el contrario, los cultivos presentaron ligeramente una menor cantidad de brotes, pero la oxidación fue menor y presentan una coloración muy favorable. Cualitativamente se mostró una estrecha relación entre el tipo de medio de cultivo utilizado y el regulador adicionado, siendo mas eficiente la utilización de BA para el medio MS y Kin para el medio McCown's.

La oxidación puede deberse principalmente por la acumulación de compuestos fenólicos y principalmente al etileno. También se puede atribuir los problemas oxidativos, a cierta sensibilidad a los reguladores de crecimiento, pues fue más notorio en aquellos que presentaban una mayor concentración del regulador (George, 1993).

Schuler y col. (2005) demostraron que *Cordia alliodora* presentaba una tasa de pérdida muy alta en el cultivo de tejidos vegetales catalogándola como una especie recalcitrante para el cultivo *in vitro*. *C. elaeagnoides* también podría considerarse una especie recalcitrante para el cultivo de tejidos, debido a la tasa de pérdida, ocasionada por la oxidación y acumulación de etileno, lo cual fue difícil controlar y ocasionó un detrimento considerable en los brotes.

7.3 Control de oxidación en explantes.

Después de transcurridos 45 d del establecimiento, de acuerdo a los análisis de varianza, se encontró que no se presentaba significancia para la presencia o ausencia de carbón activado ($p= 1.000$) o para la utilización de ácido cítrico y ascórbico ($p= 0.7260$); sin embargo, se presentó un alta significancia para la presencia de nitrato de plata ($p=0.0000$), lo que coincide con varios autores que señalan al nitrato de plata como un inhibidor del etileno (George, 1993; Pimienta y col., 2006). Al realizar la comparación múltiple de medias

mediante la prueba LSD, se encontró que el mejor tratamiento era aquel que se encontraba en presencia de nitrato de plata donde se oxidaron en promedio el 14.50 % de los tejidos, mientras que en ausencia de éste se oxidaban hasta el 33.75 %.

Cualitativamente se observó una disminución en la abscisión de las hojas, además de contrarrestar el desarrollo de callo basal pubescente, por lo que puede favorecer el enraizamiento al establecer una conexión directa de la parte apical con la radicular (Fig. 3f).

7.4 Inducción de rizogénesis y elongación de tallos.

Para el experimento que no contenía antioxidantes, se reportó que después de transcurridos 45 d del establecimiento, dos factores presentaban alta significancia: Para estimulación de raíces, la concentración del regulador reportó alta significancia ($p=0,0001$) (Fig. 3g). La presencia o ausencia de luz presentó alta significancia para inducción de brotes ($p=0,000$). Siendo la presencia de luz el mejor tratamiento para generar brotes (Cuadro 5)

Al realizar la comparación múltiple de medias mediante la prueba LSD para la inducción de raíces, se encontró que la mayor estimulación de rizogénesis después de los 45 d (Fig. 4a), la ejercían los tratamientos en presencia de ácido indol-3butírico en concentraciones de 2.5 y 5 mg/L (Cuadro 4). Las auxinas están involucradas en casi todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta, desde el estado embrionario hasta el estado reproductivo. Una de sus funciones es la elongación de los tallos por medio de la estimulación de la división celular y también la formación del sistema radicular (Pimienta y col., 2006). Por lo que su aplicación exógena resulta ser esencial en diferentes especies para inducción de rizogénesis, tal es el caso de *C. elaeagnoides*, pues en una especie estrechamente emparentada como *Cordia alliodora*; Schuler y col (2005) intentaron su enraizamiento solamente con la adición de sacarosa (15 g/L) y carbón activado (2 g/L), obteniendo resultados nulos. Por el contrario Tacoronte y col. (2004) lograron el enraizamiento de

Swietenia macrophylla por medio de un balance entre auxinas y citocininas (0.089 g/L de ácido indol 3-butírico (AIB), 0.022 g/L de ácido naftalenacético (ANA), 0.004 g/L de cinetina).

Cuadro 4. Comparación múltiple de medias para el número de raíces de *Cordia allagoides* estimuladas en diferentes concentraciones de ácido indol 3-butírico (AIB) a los 45 d.

Regulador	Repeticiones	Raíces promedio	Grupos homogéneos
0 mg/L	20	0.2	a
2.5 mg/L	20	3.7	b
5 mg/L	20	4.5	b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes $\alpha=0.05$ mediante la prueba LSD (Diferencias Mínimas Significativas).

Después de transcurridos los 45 d se observó una tasa de pérdida de tejidos muy alta, todo debido a la excesiva producción de etileno, pues el ácido indol acético como otras auxinas sintéticas, pueden incrementar la producción de etileno (Fig. 4g y b) (Pimienta y col., 2006). La ausencia de luz prepara a los explantes para el enraizamiento por medio de la estimulación de la producción de auxinas, por lo que la utilización de técnicas como la etiolación permiten iniciar el proceso de rizogénesis (George, 1993).

La presencia de luz conservaba un mayor número de brotes, por el contrario la etiolación generaba una alta tasa de pérdida de los tejidos, primeramente debido a la baja tasa de fotosíntesis, por lo que los tejidos se comienzan a tornar amarillentos y posteriormente mueren. El segundo efecto negativo de la etiolación fue la estimulación de producción de etileno, por lo que la abscisión y muerte de los brotes era cada vez mayor conforme el transcurso del tiempo.

Cuadro 5. Comparación múltiple de medias para el número de brotes de *Cordia allagoides* estimuladas por la luz después de los 45 d.

Lux	Repeiciones	Número de brotes	Grupos homogéneos
0	30	0.266	a
1500 lux	30	1.43	b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes $\alpha=0.05$ mediante la prueba LSD (Diferencias Mínimas Significativas).

Se recomienda experimentar con diferentes periodos de etiolación, que permitan obtener mejores resultados y observar la elongación de los mismos, ya que en el presente experimento no se logró observar por la pérdida de la mayoría de los explantes.

Al utilizar agentes antioxidantes después de transcurridos 45 d, no se observó rizogénesis en ninguno de los brotes establecidos, probablemente por la adición de nitrato de plata, el cual es un inhibidor del etileno. Muchos de los efectos de las auxinas se deben a la participación del etileno (Pimienta y col., 2006), al inhibir en este caso la producción de etileno, la actividad de las auxinas se afectó, por lo que se recomienda utilizar para el enraizamiento otros agentes antioxidantes.

La utilización de 1500 lux fue altamente significativa ($p=0.0001$) para la elongación de los tallos (Fig. 4d) (Cuadro 6), aumentando en promedio 0.7 cm, mientras que en etiolación sólo aumentaban 0.3 cm. La etiolación es recomendada para la elongación de los tallos y como fase inicial a la inducción de rizogénesis (Flores- Vindas, 1999; George, 1993; Hartmann y col., 2002); sin embargo, en este caso por el aumento en la producción de etileno no resulto ser satisfactoria (Fig. 3h).

Cuadro 6. Comparación múltiple de medias para elongación de brotes de *Cordia elaeagnoides* A.DC. (Boraginaceae) estimuladas por la luz después de los 45 d.

Luz	Repeticiones	Elongación de brotes	Grupos homogéneos
0	30	0.76	a
1500 lux	30	1.215	b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes $\alpha=0.05$ mediante la prueba LSD (Diferencias Mínimas Significativas).

7.5 Establecimiento de estacas de *Cordia elaeagnoides* en invernadero.

7.5.1 Establecimiento de estacas: Pruebas con enraizadores y sustratos.

Después de transcurridos 60 d del establecimiento, no se muestran resultados significativos. No se observan callos ni raíces que nos hagan suponer un indicio de rizogénesis. Por el contrario, hasta el 80 % de las estacas establecidas se habían perdido; primeramente, se presentó amarillamiento de las hojas presentes y posteriormente su abscisión (Fig. 4f), enseguida se manifestó pérdida de turgencia de la estaca, desecación y posteriormente muerte. Del total de estacas que permanecieron vivas tampoco eran observados indicios de enraizamiento (Fig. 4c); sin embargo, mantenerlas en observación por un periodo mayor, podría arrojar resultados positivos. Se recomienda también probar con diferentes sustratos y temperaturas con la finalidad de encontrar los requerimientos óptimos para su propagación. No existen estudios sobre su propagación asexual, solamente se refiere que puede realizarse vía estacas, pero no se reconocen tratamientos para el enraizamiento de las mismas (CONAFOR, 2006).

7.5.2 Establecimiento de estacas: Pruebas con tapete térmico.

Tomando en cuenta las indicaciones antes mencionadas, al realizar el segundo experimento se lograron obtener mejores resultados. Después de los 60 d del cultivo, no se mostró significancia estadística para la presencia o ausencia de tapete térmico, pero si se logró obtener un gran avance con respecto al experimento anterior, pues para el caso de las repeticiones que se encontraban sobre tapete térmico, el 56.25% de las estacas establecidas habían logrado enraizar (Fig. 5a), en contraste con el 31.25% de aquellas que no contaban con este aditamento (Fig. 5b). Igualmente, aquellas que se encontraban en el tapete presentaban un basto desarrollo de raíces adventicias y principales (Fig. 5c), en promedio 3.53 raíces principales en contraste con 1.4 en aquellas en las que no fue usado el tapete (Fig.5d). Asimismo, la longitud de las raíces (Fig. 5e) y la formación de callo (Fig. 5g) era más evidente en aquellas que se utilizó el tapete térmico, que en aquellas que no (Fig.5f y h). Es conveniente mencionar que en el 80% de las estacas establecidas se presentaba clorosis en las hojas basales. Se recomienda ampliar este experimento a un mayor número de repeticiones.

La temperatura juega un papel primordial en la propagación de plantas. Existen especies vegetales que se desarrollan satisfactoriamente si se garantiza una temperatura radicular óptima (20-22 °C), tal es el caso también de la multiplicación por estacas, debe asegurarse una temperatura adecuada para el desarrollo radicular, para muchas plantas de origen tropical como en el caso de *Cordia*, debe buscarse una temperatura en la parte basal de unos 25 °C y en la parte superior de 2 a 3° C menos (Jiménez, 1990). El uso del tapete térmico, permitió lograr una temperatura constante en la parte basal de la estaca, logrando así, un mejor desarrollo radicular.

La humedad relativa es un factor de gran importancia en la propagación asexual, por lo que para lograr humedades altas y poca pérdida de agua de la estaca, se recurre a varios métodos, como eliminar las hojas o parte de ellas, usar niebla o colocar túneles o plástico fino sobre ellas, como en este caso.

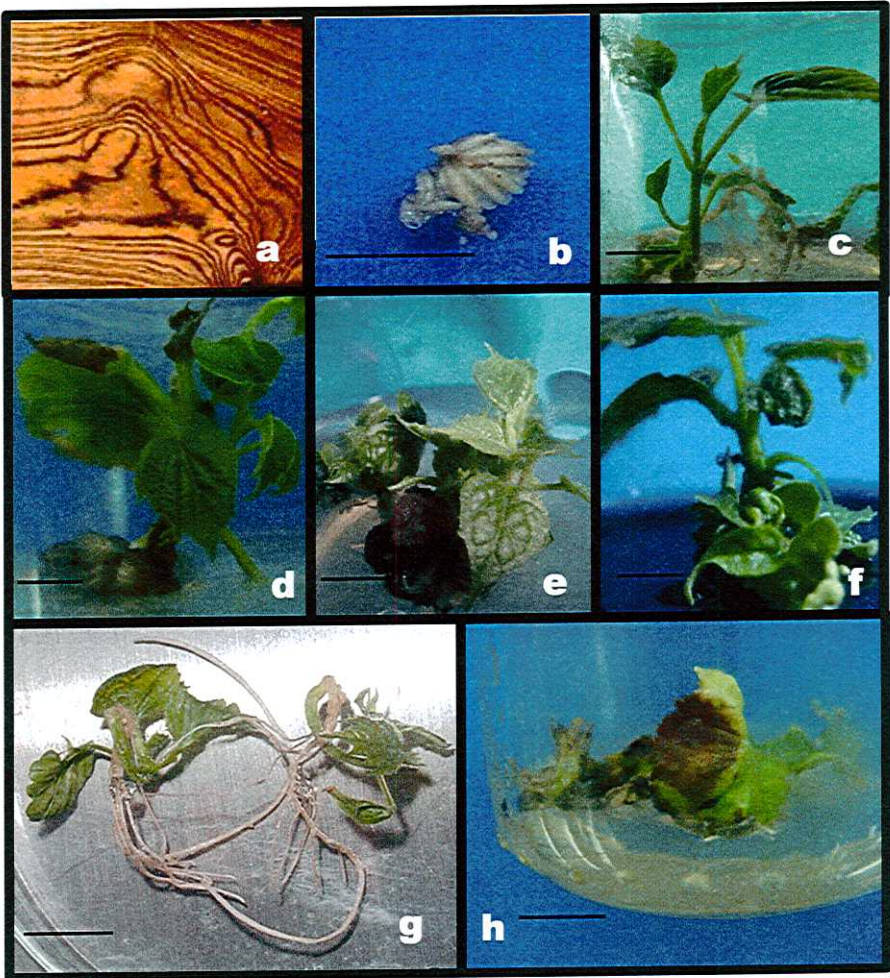


Figura 3: Propagación *in vitro* de *Cordia elaeagnoides*: Establecimiento y Proliferación (Barras= 1 cm); **a)** Madera; **b)** Inicio de germinación a 2 d **c)** Plantas germinadas a 15 d; **d)** Inicio de problemas oxidativos a 30 d; **e)** Fase proliferación de yemas; **f)** Control de oxidación a 30 d; **g)** Fase enraizamiento a 30 d; **h)** Brotes sin control de oxidación.

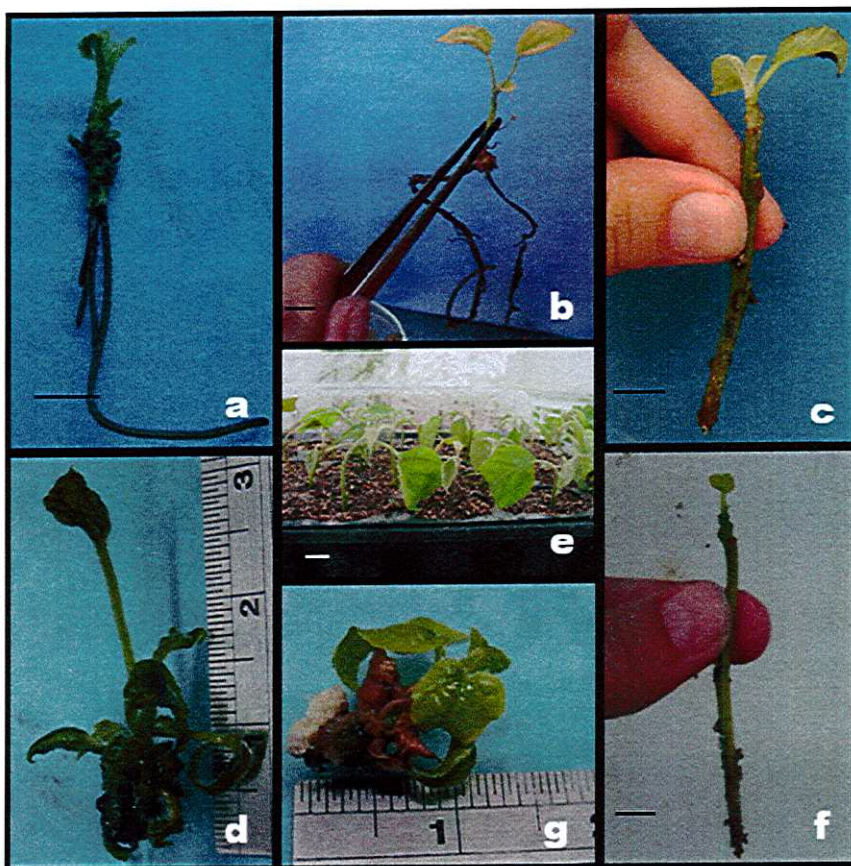


Figura 4. Propagación de *Cordia elaeagnoides*: Enraizamiento y propagación por estacas (Barras= 1 cm): **a)** Fase enraizamiento a 45 d; **b)** Problemas de amarillamiento durante enraizamiento *in vitro* a 30 d; **c)** Propagación por estacas a 60 d; **d)** Fase elongación de brotes *in vitro* a 45d; **e)** Establecimiento de estacas en invernadero a 30 d; **f)** Estacas en invernadero a 60 d; **g)** Problemas oxidativos durante la elongación y enraizamiento *in vitro*.

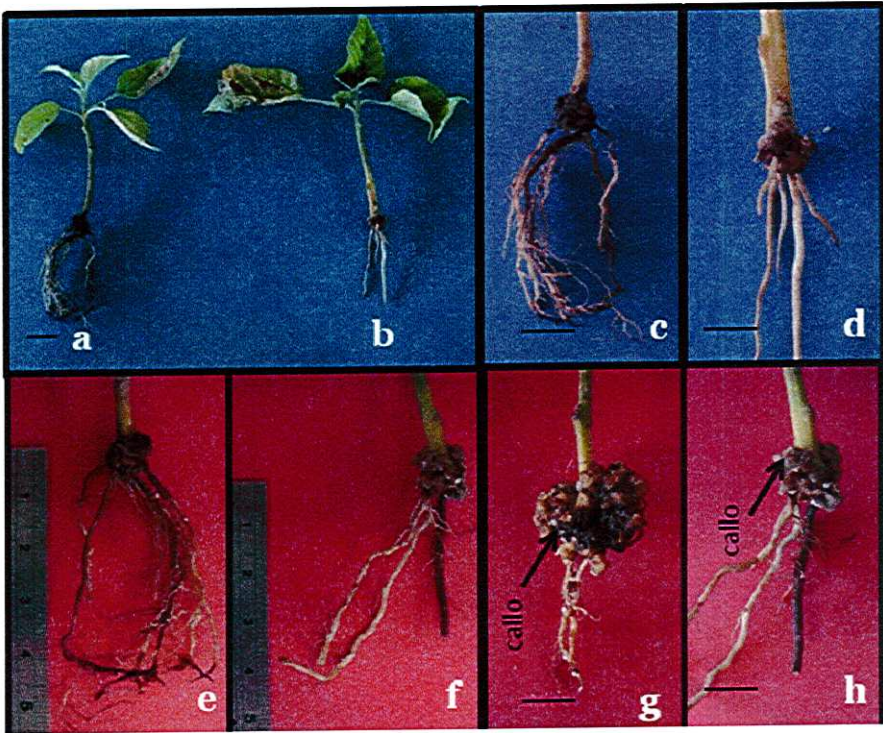


Figura 5. Propagación por estacas de *Cordia elaeagnoides*: Pruebas con tapete térmico (Barras= 1 cm): **a) y b)** Comparación entre pruebas con tapete térmico (a) y sin tapete (b); **c) y d)** Diferencias por número de raíces principales y adventicias. Con tapete (c) y sin tapete (d); **e) y f)** Diferencias entre la longitud de las raíces. Con tapete (e) sin tapete (f); **g) y h)** Contrastes entre la formación de callo. Con tapete (g) sin tapete (h).

8. CONCLUSIONES

La técnica de rescate de embriones resulta ser eficiente para la propagación masiva de *Cordia elaeagnoides*.

Con los reguladores Cinetina (Kin) y Benciladenina (BA) se obtuvieron mejores resultados para la estimulación de brotes de *Cordia elaeagnoides* y muestran una tendencia más eficiente en concentraciones de 1 y 2 mg/L.

El tipo de medio basal utilizado no presentó significancia alguna; sin embargo, presenta una tendencia con el tipo de regulador, con el cual se combina, siendo ligeramente más eficiente en la producción de brotes la utilización de BA para el medio MS y Kin para el medio de McCown's.

La utilización de nitrato de plata es importante para el control de oxidación en el cultivo *in vitro* de *C. elaeagnoides*.

La aplicación de auxinas (indol-3 butírico) es necesaria para la inducción de raíces y se recomienda la dosis más baja (2.5 mg/L) para economizar material.

Para elongar los tallos se recomienda exponerlos a 1500 lux o se sugiere utilizar periodos más cortos de etiolación.

9. RECOMENDACIONES

Para evitar la pérdida de los tejidos durante el enraizamiento se sugiere evaluar otros antioxidantes diferentes al nitrato de plata o inhibidores del etileno.

Se recomienda realizar estudios más amplios para la propagación vía estacas y para llevar a cabo la adaptación *ex vitro* de las plantas propagadas en laboratorio.

10. LITERATURA CITADA

- Audesirk, T. G. Audesirk. 1997. Biología: La vida en la tierra, 4ta ed. México. Person Educación Latinoamericana. 948 p.
- Barajas-Morales, J. 1981. Descriptions and notes on the wood anatomy of Boraginaceae from western México. IUWA Bull. n.s. Vol 2(23): 61-67.
- Barajas-Morales, J. y C. León. 1989. Anatomía de maderas de México: Especies de una selva baja caducifolia. Publicaciones Especiales 1. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. 124 p.
- Carpineti, L. 2004. Importancia de la silvicultura monoclonal. Inta. Idiaxxi.4(7):147-150.
- CONAFOR. 2006. SIRE. Paquetes tecnológicos: *Cordia elaeagnoides* A DC. www. Conafor.gob.mx/portal/docs 18 octubre 2008.
- Concepción, O., L. Nápoles, A. Pérez, M. Hernández, N. Peralta y R. Trujillo. 2005. Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.).Relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. Cultivos tropicales. Vol. 26 (1): 33-39.
- FAO. 1994. Biotechnology in forest tree improvement. Based on the work of Haines Fao forestry paper 118. FAO. Rome. 230 p.
- FAO. 2005. Situación de los bosques del mundo 2005. Roma. www. fao.org/docrep/007/ y55745/y5574500.htm 23 noviembre 2008
- FAO. 2007. Situación de los bosques en el mundo 2007. Informe principal. Estudio FAO: Montes. Roma. 141 p.
- Flores-Vindas E. 1999. La planta: Estructura y función. Vol.2. Costa Rica. LUR.367 p.
- Gaspar, P. A. 2008. Germinación de semillas e inducción de brotes de *Cordia elaeagnoides* A.DC. (Boraginaceae). Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara. México. 54 p.
- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 2, In practice. Exegetics Limited. Gran Bretaña. pp. 647-659.

- González, G. J., X. Madrigal, A. Ayala, A. Juárez y E. Gutiérrez. 2006. Especies arbóreas de uso múltiple para la ganadería de la región caliente del estado de Michoacán, México. Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo. <http://www.cupav.org.co/lrrd/lrrd1818/gonz10109.htm>. 18 octubre 2008.
- Harold, W. y J. Hocker. 1984. Introducción a la biología forestal. México. Ed. A.G.T. 446 p.
- Hartmann, H., D. Kester, F. Davies y R. Genere. 2002. Plant propagation: Principles and practice. 7 ed. Prentice Hall. 760 p.
- Hernández, T., M. Canales, J. Ávila, A. Durán, J. Caballero, A. Romo de Vivar y R. Lira. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology*. 88(2-3): 181-188.
- Hurtado, M.D y M. Merino. 1988. Cultivo de tejidos vegetales. México. 1era ed. Trillas. pp. 15-30.
- Jiménez, R. y M. Caballero. 1990. El cultivo industrial de plantas en maceta. Ediciones de Horticultura S.L. España. pp.64-90.
- Ladrach, W. 2005. Reforestación. Ciclo de Conferencias. Universidad de Bogotá-Jorge Tadeo Lozano. Bogota, Colombia. 49 p.
- León, G. 1985. Patrones de variación de las características anatómicas de la madera en *Cordia elaeagnoides* A. DC. Tesis Licenciatura. UNAM. México. 113 p.
- Lomelí, R. M. G. 1991. Determinación de la durabilidad de las maderas de árboles tropicales (*Hura polyandra* Baill., *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb y *Cordia elaeagnoides* A. DC.) al ataque de los hongos xilófagos, *Gutinus lepideus* Fr. y *Laetiporus sulphureus* (Bull. Ex Fr.). Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Guadalajara. 56 p.

- Martínez, J y A. Fernández. 2004. Cambio climático: una visión desde México. Instituto Nacional de Ecología. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. 523 p.
- McCown, B.H. y G. Lloyd. 1981. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel (*Kalmia latifolia*) by shoot tip culture. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30: 421-427.
- Morán, J. 2002. Causas económicas e incidencia del comercio internacional en la deforestación en México. Centro Mexicano de Derecho Ambiental, A. C. México. pp. 25-48.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.
- Niembro, R.A. 1986. Árboles y arbustos útiles de México: Naturales e Introducidos. Editorial Limusa. México. 206 p.
- Niembro, R.A. 1989. Semillas de plantas leñosas: Morfología comparada. México. Limusa. pp. 44-46.
- Nieves, N., M. Cid, D. Pina, Y. Lezcano, J. M. Torne. 2007. Efecto del tiosulfato de plata sobre la embriogénesis somática y la semilla artificial de caña de azúcar. Agronomía Costarricense. 31(2): 87-94.
- Ojeda, Z. M., H. L. Olvera, L. M. Ramos, M.J. Star, T. Cepeda, P. Alférez, L. I. Donjuan, E. O. Sáenz, R. Sáenz y E. C. Cerda. 2006. Multiplicación *in vitro* del Piñón Azul *Pinus maximartinezii* (Rzedowski). OYTON. International Journal of Experimental Botany. Argentina. 75: 109-113.
- Pennington, T. D. y J. Sarukhán. 1998. Árboles tropicales de México: Manual para la identificación de las principales especies. UNAM, Fondo de Cultura Económica. México, 521 p.
- Pennington, T. D. y J. Sarukhán, 2005. Árboles tropicales de México: Manual para la identificación de las principales especies. UNAM, Fondo de Cultura Económica. México, 523 p.

- Pérez, O.C. 1993. Anatomía de la madera de ocho especies de importancia en las artesanías del estado de Michoacán. Universidad Autónoma Metropolitana. Acta Botánica Mexicana. 23: 103- 136.
- Pimienta, B.E., A. Muñoz, B. Ramírez y L. Méndez. 2006. Desarrollo vegetal. Universidad de Guadalajara. México. 331 p.
- Regla, C. 2007. Avances en la micropropagación de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. (Bignoniaceae) y *Cordia elaeagnoides* A. DC. (Boraginaceae). Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara. México. 39 p.
- Rodríguez, N. N., M. Capote y V. Zamora. 1999. Cultivo *in vitro* del aguacatero (*Persea americana* Mill.). Revista Chapingo Serie Horticultura 5: 231-237.
- Rojas. G.M. y M. Rovalo.1985. Fisiología vegetal aplicada. México. Mc Graw-Hill. 303 p.
- Rzedowski, J. 1981. Vegetación de México. Limusa. México, D.F. pp. 169-350.
- Rzedowski, J. 1983. Vegetación de México. Limusa. México, D.F. pp. 151-349.
- Rzedowski, J. 2006. Vegetación de México. 1 era ed. digital. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 504 p.
- Schuler I., S. Baquero, D. Gaona, E. Vega, J. Ramírez, V. Nieto y E. Hodson. 2005. Propagación *in vitro* del material seleccionado de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. (Ocobo) y *Cordia alliodora* (Ruiz y Pav) Oken (Nogal cafetero). Revista Colombiana de Biotecnología 7(1): 39-50.
- Sonsire, O. B. 1994. Memorias "Seminario Actualización en Propagación Vegetativa y Silvicultura Clonal". Revisión: El enraizamiento adventicio en especies forestales. Programa de Investigación en Especies Forestales. Área de Biotecnología Forestal. CONIF.
- Taisma, M. y C. Wolfgang. 2005. Sistema de incompatibilidad en la especie distílca *Cordia curassavica* (Jacq) R & S (Boraginaceae). Interciencia. 30(7): 431-435.

- Tacoronte, M., M. Vielma, A. Mora y C. Valecillos. 2004. Propagación in vitro de caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de yemas axilares. Acta Científica Venezolana. 55: 7-12.
- Villareal O.J. 1993. Introducción a la botánica forestal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México. Trillas. pp 121-123.
- WWF. 2008. Deforestación en México. http://www.wwf.org.mx/wwfmex/prog_bosques_deforestacion.php. 19 de septiembre del 2008.
- Willan R.L. 1991. Guía para la manipulación de semillas forestales, estudio especial referencia a los trópicos. FAO montes. 20/20. 502 p.
- Young, A.R. 1991. Introducción a las ciencias forestales. Limusa. México. 633 p.

BIBLIOTECA