



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN CIENCIAS FORESTALES

Clonación de progenies de árboles selectos de un huerto semillero sexual de *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham.

SÁNCHEZ REYES GRICELDA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2016

La presente tesis titulada: "Clonación de progenies de árboles selectos de un huerto semillero sexual de *Pinus leiophylla* Schiede ex Schldl. & Cham." realizada por la alumna: **Gricelda Sánchez Reyes**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
EN CIENCIAS FORESTALES**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Marcos Jiménez Casas

ASESOR



Dr. Jesús Jasso Mata

ASESOR



Dra. Virginia Rebolledo Camacho

Montecillo, Texcoco, Estado de México, octubre de 2016

CLONACIÓN DE PROGENIES DE ÁRBOLES SELECTOS DE UN HUERTO SEMILLERO SEXUAL DE *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham.

Gricelda Sánchez Reyes, MC.
Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

En silvicultura clonal; una de las técnicas de propagación clonal que se ha venido perfeccionando a lo largo de tiempo son los mini-esquejes, obtenidos a partir de brotes producidos en una planta madre o seto. Para la obtención de brotes vigorosos y de buena calidad es necesario la implementación de técnicas en vivero: podas (movilidad de hormonas) o fertilización (incremento en carbohidratos). En especies del genero *Pinus* es difícil el enraizamiento por el estado de madurez de la planta madre, tamaño del mini-esqueje, las condiciones ambientales en la cámara de enraizado o por la dosis de auxina proporcionada. Por otro lado existen factores que nos ayudan a aumentar el porcentaje de enraizamiento, como son los pre-tratamientos de sombreado, etiolación, control de la temperatura y de humedad relativa, etc.

En el caso de *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. se ha trabajado con el enraizamiento de mini-esquejes, probando diferentes dosis de auxina (AIB) y distintos sustratos, obteniendo bajos porcentajes de enraizamiento por lo que es necesario incrementar los porcentajes para obtener planta en corto plazo, con la calidad requerida para reforestar y restaurar sitios degradados.

Es así como en el primer capítulo se estudió el efecto que tiene la fertilización en setos de *P. leiophylla* para la producción de brotes, utilizados como mini-esquejes, necesarios para el mejoramiento y producción de planta utilizada principalmente para huertos clonales y plantaciones comerciales. Este experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con dos factores a probar fertilización (con y sin) y familia (F51, F101, F105); generando 6 tratamientos con 12 réplicas, usando un total de 72 plantas. Los brotes de cada planta donadora fueron contados y medidos, además se midió el diámetro al cuello de la raíz; por otro lado se monitoreo la fenología del brote en plantas que fueron fertilizadas, con respecto de las que no lo fueron, los resultados muestran que la fertilización, incrementó el número y la longitud de los brotes y se aceleró el crecimiento de la yema en las que fueron fertilizadas.

El segundo capítulo evaluó porcentaje de enraizamiento, numero de raíces y el crecimiento en altura y diámetro de los ramets generados de las progenies de los tres arboles selectos tratados en dos condiciones de sombra. El experimento se estableció bajo un diseño al azar con arreglo factorial 3x2x2: tres familias (51, 101, 105), fertilización (con y sin) y dos tratamientos de sombra (50% y expuesta a luz natural), generando 12 tratamientos. Cada tratamiento con 4 repeticiones y 10 réplicas (mini-esquejes). Los resultados arrojan los mejores porcentajes en la familia 101 con el tratamiento de fertilización y sombra con 42.5%; en cuanto al número de raíces no se encontraron diferencias significativas; tampoco en la altura y diámetro de las plántulas a los cuatro meses de edad.

El tercer capítulo evaluó los porcentajes de enraizamiento, numero de raíces y el crecimiento de las plantas procedentes mini-esquejes etiolados de la progenie de árboles

de *P. leiophylla*. El experimento se estableció bajo un diseño al azar con arreglo factorial 3x4x2: tres familias (51, 101, 105), cuatro periodos de etiolación (testigo, 7 días, 14 días, 21 días) y dos concentraciones de AIB (ácido indolbutírico) (testigo y 5000 ppm), generando 24 tratamientos. Cada tratamiento con 12 réplicas. Los resultados mostraron que la etiolación a 21 días incremento los porcentajes de enraizamiento, en comparación con el testigo; La dosis de 5000 ppm de AIB, fue mayor con respecto al testigo; la familia que tuvo una mejor respuesta con respecto a los tratamientos fue la 105, seguida de la familia 51 y después la familia 101; lo que muestra que la interaccion que existe entre los factores, etiolación y la dosis de AIB son importantes para la supervivencia de los mini-esquejes. Para el crecimiento de los mini-esquejes, se registran diferencias entre cada una de las familias.

Palabras clave: *Pinus leiophylla*, propagación vegetativa, fertilización, poda, clonación, sombra al 50%, dosis de AIB, etiolación, familia.

**CLONING OF PROGENY OF TREES SELECTOS A SEED ORCHARD SEXUAL
Pinus leiophylla Schiede ex Schltdl. & Cham.**

Gricelda Sánchez Reyes, MC.
Colegio de Postgraduados, 2016

ABSTRACT

In clonal forestry; one of the techniques of clonal propagation that has been refined over time are the mini-cuttings, obtained from buds produced in a parent plant or hedge. To obtain vigorous shoots and good quality is necessary to implement nursery techniques: pruning (mobility of hormones) or fertilization (increase carbohydrate). In species of the genus *Pinus* is difficult rooting for the state of maturity of the mother plant, cutting mini-size, environmental conditions in the chamber rooted or auxin dose provided. On the other hand there are factors that help us to increase the percentage of rooting, such as pre-treatments shading, etiolation, control of temperature and relative humidity, etc.

In the case of *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. has worked with the rooting of mini-cuttings, testing different doses of auxin (AIB) and different substrates, obtaining low percentages of rooting so it is necessary to increase the percentage for plant in the short term, with the quality required to reforest and restore degraded sites.

Thus in the first chapter the effect fertilization hedges *P. leiophylla* for producing buds, used as mini-cuttings, which are necessary for the improvement and production plant used mainly for clonal orchards and commercial plantations was studied. This experiment was established under a completely randomized design with two factors to try fertilization (with and without) and family (F51, F101, F105); generating six treatments with 12

replicates, using a total of 72 plants. Outbreaks of each donor plant were counted and measured, also the diameter at root collar was measured; on the other hand phenology outbreak in plants were fertilized with respect to which they were not was monitored, the results show that fertilization increased the number and length of shoots and growth of the yolk accelerated in the which they were fertilized.

The second chapter assessed rooting percentage, number of roots and growth in height and diameter of the ramets generated from the progeny of the three selected trees treated in two shade conditions. The experiment was established under a randomized design with factorial arrangement 3x2x2: three families (51, 101, 105), fertilization (with and without) and two shade treatments (50% and exposed to natural light), generating 12 treatments. Each treatment with 4 replicates and 10 replications (mini-cuttings). The results show the best percentages in the 101 family with fertility treatment and shade with 42.5%; in the number of roots, no significant differences were found; either in the height and diameter of the seedlings at four months of age.

The third chapter rooting percentages evaluated, number of roots and plant growth from etiolated seedlings mini progeny tree *P. leiophylla*. The experiment was established under a randomized design factorial 3x4x2 with: three families (51, 101, 105), four periods of etiolation (witness, 7 days, 14 days, 21 days) and two concentrations of AIB (indole butyric acid) (witness and 5000 ppm), generating 24 treatments. Each treatment with 12 replicates. The results showed that etiolation to 21 days increase rooting percentages compared with the control; The dose of 5000 ppm of AIB, was higher compared with the control; family had a better response with respect to treatment was 105, followed by the family 51 and family after 101; It is showing that the interaction between the factors,

etiolation and dose of AIB are important to the survival of mini-cuttings. For the growth of mini-cuttings, differences between each of the families are recorded.

Key words: *Pinus leiophylla*, Cloning, vegetative propagation fertilization, adventitious buds, conifers.

Dedicatoria

A:

Mi mamá.

Mis hermanos.

Mis sobrinos.

Pero sobre todo para mi persona favorita

Cariñosamente...

Agradecimientos:

A **Dios** por darme la oportunidad y la fuerza para seguir adelante, por darme la familia y amigos que están conmigo, a pesar de la distancia y por ser mi mayor guía espiritual.

Al **Colegio de Postgraduados**, por ser la institución que me brindó la oportunidad de seguir con mis estudios.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** quien fue la fuente de subsidio para mi sustento durante el periodo de la maestría.

Al **Dr. Marcos Jiménez Casas** por la confianza, el apoyo, la motivación, el aliento y el asesoramiento para la realización y conclusión de este trabajo.

Al **Dr. Jesús Jasso Mata** y a la **Dra. Virginia Rebolledo Camacho**, por sus valiosas observaciones y aportaciones que ayudaron a enriquecer y a mejorar este trabajo.

A **Luis Méndez Hidalgo**, por sus atinados consejos en el establecimiento de mis experimentos, pero sobre todo por ser mí mejor amigo. Gracias por sus pláticas y su compañía.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. LITERATURA CITADA	4
3. OBJETIVO GENERAL.....	6
3.1 Objetivos específicos	6
4. HIPÓTESIS.....	7
CAPITULO I. MANEJO DE SETOS DE PROGENIES DE <i>Pinus leiophylla</i> PARA AMPLIFICAR LA PRODUCCIÓN DE BROTES (MINI-ESQUEJES).....	8
RESUMEN.....	8
ABSTRACT	9
1.1 INTRODUCCIÓN.....	10
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
1.2.1 Sitio experimental.....	12
1.2.2 Condiciones de la planta	12
1.2.3 Diseño experimental y tratamientos	13
1.2.4 Variables evaluadas	13
1.2.5 Análisis de datos y modelo estadístico	14
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
1.3.1 Crecimiento en DCR de planta donadora.....	15

1.3.2 Fenología del brote	17
1.3.3 Producción de brotes	18
1.3.4 Efecto de la fertilización sobre el crecimiento de brotes.....	20
1.4 CONCLUSIONES.....	21
1.5 LITERATURA CITADA	22
CAPITULO II. ENRAIZAMIENTO DE MINI-ESQUEJES DE PROGENIES DE <i>Pinus leiophylla</i>, BAJO TRATAMIENTOS DE FERTILIZACIÓN Y SOMBRA	25
RESUMEN.....	25
2.1 INTRODUCCIÓN	28
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.2.1 Sitio experimental.....	30
2.2.2 Material vegetal	30
2.2.3 Tratamientos y diseño experimental.....	31
2.2.3.1 Sombra y fertilización	31
2.2.3.2 Obtención de mini-esquejes	31
2.2.4 Trasplante de los mini-esquejes.....	32
2.2.5 Variables a evaluar.....	33
2.2.6 Crecimiento de las plantas de <i>P. leiophylla</i>	33
2.2.7 Análisis de datos	34
2.2.8 Modelo estadístico	34
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35

2.3.1 Efecto de la familia, enraizado y sombra.....	35
2.3.2 Efecto de los tratamientos.....	37
2.3.3 Número y Longitud de las raíces.....	39
2.3.4 Crecimiento de los mini-esquejes.....	40
2.3.4.1 Altura.....	40
2.3.4.1 Diámetro.....	41
2.4 CONCLUSIONES	41
2.5 LITERATURA CITADA.....	42
CAPITULO III. ENRAIZAMIENTO DE MINI-ESQUEJES DE <i>Pinus leiophylla</i> OBTENIDOS DE SETOS ETIOLADOS.....	45
RESUMEN.....	45
3.1 INTRODUCCIÓN	48
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.2.1 Sitio experimental.....	50
3.2.2 Material vegetal.....	50
3.2.3 Tratamientos y diseño experimental.....	51
3.2.3.1 Etiolación.....	51
3.2.4 Obtención de mini-esquejes y aplicación de AIB.....	51
3.2.5 Trasplante de mini-esquejes enraizados.....	53
3.2.6 Variables a evaluar.....	53
3.2.7 Evaluación del desarrollo de los mini-esquejes etiolados	54

3.2.9 Modelo estadístico	55
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
3.3.1 Etiología.....	56
3.3.2 Enraizamiento de mini-esquejes	57
3.3.2.1 Efecto de las fuentes de variación.....	57
3.3.2.2 Supervivencia.....	57
3.3.2.3 Efecto familia.....	58
3.3.2.4 Efecto AIB	58
3.3.2.5 Efecto etiología	59
3.3.3 Interacciones.....	60
3.3.3.1 Supervivencia.....	60
3.3.3.2. Enraizamiento	61
3.3.3.3 Formación de callo	63
3.3.4 Crecimiento y Morfología de raíces.....	64
3.3.5 Morfología de mini-esquejes enraizados.....	66
3.3.6 Crecimiento y morfología de clones	68
3.4 CONCLUSIÓN	71
3.5 LITERATURA CITADA.....	72
5.CONCLUSIONES GENERALES	75

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Valores de significancia (<i>P</i>) del análisis de varianza de los efectos de tratamientos sobre las variables evaluadas en el experimento en plántulas de <i>P. leiophylla</i>	16
Cuadro 2. Tratamientos de fertilización y sombra realizados a plantas procedentes de tres familias de <i>P. leiophylla</i> de 16 meses de edad.	32
Cuadro 3. Porcentajes de supervivencia, mini-esquejes enraizados y con callo de cada factor en el enraizamiento de mini-esquejes de <i>P. leiophylla</i>	36
Cuadro 4. Valores de significancia (<i>P</i>) del análisis de varianza de los efectos de tratamientos sobre las variables evaluadas en el experimento en plántulas de <i>P. leiophylla</i>	39
Cuadro 5. Valores medios y error estándar para cada altura de las plantas de <i>P. leiophylla</i>	40
Cuadro 6. Periodos de tratamientos de etiolación realizados a plantas procedentes de tres familias de <i>P. leiophylla</i> de 24 meses de edad; y tratamientos posteriores de AIB a los mini-esquejes generados de las plantas previamente etioladas.....	52
Cuadro 7. Valores de significancia (<i>P</i>) del análisis de varianza para enraizamiento (ER), formación de callo (CAL) y supervivencia (SUP) de mini-esquejes de <i>P. leiophylla</i>	57
Cuadro 8. Porcentajes de enraizamiento, callo y supervivencia en cada factor probado en el experimento de enraizamiento de mini-esquejes de <i>P. leiophylla</i>	60
Cuadro 9. Valores de significancia <i>P</i> del análisis de varianza de los efectos de tratamientos sobre altura y diámetro a base de tallo y morfología de raíz en mini-esquejes enraizados de <i>P. leiophylla</i>	65

Cuadro 10. Valores medios y error estándar para cada factor en la morfología de raíz de mini-esquejes de <i>P. leiophylla</i>	66
Cuadro 11. Plantas de <i>P. leiophylla</i> producidas de los mini-esquejes después de tres meses de trasplante.....	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fases consideradas para evaluar la fenología de los brotes en plantas de *P. leiophylla* tratadas con fertilizante: a) Fase 0: sin yema, b) Fase 0.5: aparición de yemas color marrón, c) Fase 1: alargamiento de las yemas, d) 1.5: rompimiento de las yemas en coloración verde ≤ 1 cm, e) 2: crecimiento de brotes ≤ 3 cm y f) 2.5: crecimiento de brotes ≤ 5.5 cm..... 14
- Figura 2. Efecto de la fertilización en el diámetro al cuello de raíz (DCR) en plantas de *P. leiophylla*. 1: Plantas fertilizadas, 0: Plantas sin fertilización. Valores promedio (n=36) \pm error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$)..... 17
- Figura 3. Fenología del brote en plantas de *P. leiophylla* fertilizadas (1) y sin fertilización (0). a) Fase 0: sin yema, b) Fase 0.5: aparición de yemas color marrón, c) Fase 1: alargamiento de las yemas, d) 1.5: rompimiento de las yemas en coloración verde ≤ 1 cm, e) 2: crecimiento de brotes ≤ 3 cm y f) 2.5: crecimiento de brotes ≤ 5.5 cm... 18
- Figura 4. Efecto de la fertilización para el número de brotes de plantas de *P. leiophylla*, por tratamiento. 1: Plantas fertilizadas, 0: Plantas sin fertilización. Valores promedio (n=36) \pm error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) 19
- Figura 5. Efecto de la familia para la longitud de los brotes en plantas de *P. leiophylla* por familia. Valores promedio (n=12) \pm error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$)..... 21
- Figura 6. Porcentaje de enraizamiento (A) porcentaje formación de callo (B) y porcentaje de supervivencia (C) por tratamiento de los mini-esquejes de *P. leiophylla*.

Color gris= enraizadas, callo, supervivencia, Color negro= No enraizadas, Sin callo, Muertas, F1= con fertilización, F0= sin fertilizante, S1: con sombra, S0= sin sombra.

.....	38
Figura 7. Extracción de la cámara de enraizamiento y trasplante de los mini-esquejes de <i>P. leiophylla</i>	53
Figura 8. Efecto de la exclusión de luz, en diferentes periodos (días), en el color de las acículas observadas en plantas de <i>P. leiophylla</i> sometidas a los tratamientos respectivos.	56
Figura 9. Porcentaje de supervivencia en los tratamientos de etiolación. 1: Supervivencia 0: Muertas. Et0: (0 días a oscuridad), Et7 (7 días a oscuridad), Et14 (14 días a oscuridad, Et21 (21 días a oscuridad), Au0: sin AIB, Au1:5000ppm AIB.....	61
Figura 10. Porcentaje de enraizamiento en los tratamientos de etiolación. 1: mini-esquejes enraizados; 0: no enraizados. Et0: (0 días a oscuridad), Et7 (7 días a oscuridad), Et14 (14 días a oscuridad, Et21 (21 días a oscuridad), Au0: sin AIB, Au1:5000ppm AIB.	62
Figura 11. Porcentaje de inducción de callo en los tratamientos de etiolación. 1: Formación de callo 0: sin callo. Et0: (0 días a oscuridad), Et7 (7 días a oscuridad), Et14 (14 días a oscuridad, Et21 (21 días a oscuridad), Au0: sin AIB, Au1:5000ppm AIB.	64
Figura 12. Características morfológicas de los mini-esquejes de <i>P. leiophylla</i> . Valores promedio \pm error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) A: altura de los mini-esquejes de <i>P. leiophylla</i> . B: Diámetro de los esquejes de <i>P. leiophylla</i> . 0= sin ácido indolbutírico, sin etiolación (testigo).....	67

Figura 13. Plantas de *P. leiophylla* producidas de los mini-esquejes después de tres meses de trasplante..... 68

Figura 14. Características morfológicas de los mini-esquejes de *P. leiophylla*. Valores promedio \pm error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) A: incremento en altura de las plantas de *P. leiophylla*. B: incremento en diámetro de las plantas de *P. leiophylla*. 0= sin ácido indolbutírico, sin etiolación (testigo). 1: 5000 ppm de ácido indolbutírico..... 70

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Pinus leiophylla Schiede ex Schltdl. & Cham. tiene una amplia distribución natural en México, desde Chihuahua hasta Oaxaca, en altitudes de 1600 a 3000 m (Perry, 1991); existen en condiciones subtropicales, cálidas y templadas. La capacidad de adaptación de la especie para crecer en esta variedad de ambientes, donde se incluyen sitios con baja precipitación anual y suelos pobres de materia orgánica, ha sido un factor importante para recomendar a *P. leiophylla* dentro de programas de rehabilitación y restauración de sitios degradados (Rodríguez, Vargas, Buonamici & Vendramin, 2009). Además de ser uno de los pinos más importantes en términos económicos para la producción de resina (Perry, 1991).

Muchas especies maderables que son dañadas por incendios, viento, o plagas y enfermedades tienen capacidad de responder a dicho daño y recuperar su biomasa foliar mediante el rebrote, a partir de yemas adventicias situadas en las ramas y a lo largo del fuste (Bond & Midgley, 2001).

En programas de mejoramiento genético se buscan individuos con caracteres deseables y superiores para el establecimiento de plantaciones, la propagación vegetativa mediante el uso de brotes podría ser una alternativa para la propagación masiva de individuos selectos con atributos como la tolerancia a enfermedades y plagas, salinidad, sequía, y heladas; así como para la producción de resina. Lo anterior reduciría los tiempos para obtener dichos genotipos durante el ciclo de mejoramiento genético (Hartmann & Kester. 1980).

A diferencia de las plantas producidas por semilla, los esquejes (obtenidos a partir de brotes) enraizados crecen más rápido por la cantidad de reservas almacenadas (fertilización); además de que se genera una copia idéntica del genotipo materno.

La inducción y obtención de brotes para mini-esquejes se realiza mediante el manejo de los setos a través de podas programadas. La aplicación de poda constante da lugar a la formación de los setos, al estimular el crecimiento y mantener el estado juvenil de los mini-esquejes, condición deseable para su enraizamiento. Sin embargo, en algunas especies las podas no son suficientes para producir el número de mini-esquejes requerido para la producción masiva de planta con caracteres deseables (Pavone, Avilan & Herrera, 2008). Por lo que es necesario implementar nuevas prácticas adicionales en el manejo del seto para amplificar la producción de brotes.

Además de la poda, la fertilización de la planta donadora podría amplificar la producción de brotes. Varios estudios, en especies arbóreas, han señalado que los carbohidratos son responsables de apoyar el crecimiento y proliferación de brotes (Del Tredici, 2001).

Algunos estudios indican que al reducir la intensidad de la luz con maya sombra al 50% en setos de *Cotinus coggygria*, tiene efectos positivos en el enraizamiento de mini-esquejes, obteniendo cambios en la anatomía del mini-esqueje, considerando un desarrollo del esclerénquima más delgado, ayudando a que los primordios radicales se desarrollen para formar raíces (Pacholczak, Szydlo & Jukaszewska. 2005).

En *P. leiophylla* se han realizado trabajos de propagación vegetativa con plantas de año y medio de edad con resultados de mediano éxito en sus porcentaje de enraizamiento (Cuevas, Jiménez, Jasso, Pérez, López & Villegas, 2014).

En 1991 se estableció un huerto semillero sexual de *P. leiophylla* en el municipio de Montecillo, Edo. de México, está constituido por 180 individuos de 12 procedencias de la región central de México, principalmente de los estados de México, Tlaxcala y Puebla. Este huerto, tiene el propósito de producir semilla de calidad, y progenie resistente a factores adversos teniendo así mayor probabilidad de supervivencia en las reforestaciones. El material vegetativo de los individuos que conforman el huerto semillero, permite realizar trabajos de investigación, enfocados a la producción de semilla resistente a factores bióticos y abióticos. A la fecha se han identificado genotipos de buen crecimiento, tolerantes a plagas (*Toumeyela pinicola*), salinidad moderada y sequía (para progenie de algunas familias). La propagación de esos genotipos es deseable por su alta calidad de la semilla y por su posible resistencia a factores bióticos y abióticos (Gómez, Ramírez, Jasso & López, 2010; Castelán, Jiménez, López, Campos & Vargas, 2014). Es por ello que el objetivo de esta investigación es propagar vegetativamente por medio de mini-esquejes la progenie de tres arboles selectos del huerto semillero sexual de *P. leiophylla*.

2. LITERATURA CITADA

- Bond, W., & Midgley, J. (2001). Ecology of sprouting in woody plants: the persistence niche. *Trends Inecology & Evolution*. 16 (1): 45-51.
- Castelán, M. N., Jiménez, C. M., López, D. H., Campos, G. H., & Vargas, H. J. (2014). Familial variation in *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. seedlings in response to drought: water and osmotic potential. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 21(3): 295–306.
- Cuevas, J. J. C., Jiménez, C. M., Jasso M. J., Pérez, R. P., López, U. J., & Villegas, M. A. (2014). Asexual propagation of *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. *Revista Chapingo. Ciencias Forestales y del Ambiente* 1:1-15.
- Del Tredici. P. (2001). Sprouting in temperate trees: A morphological and ecological. *The Botánica Review*. 67(2): 121-137.
- Hartmann, H., & Kester, D. (1980). *Propagación de plantas. Principios y prácticas*. México. Compañía Editorial Continental S. A.
- Gómez, J. D., Ramírez, H. C., Jasso, M. J., & López, U. J. (2010). Variación en características reproductivas y germinación de semilla de *Pinus leiophylla*. *Revista Fitotecnia*. 33(4):297-309.
- Pacholczak. A., Szydło. W., & Lukaszewska. A. (2005). The effect of etiolation and shading of stock plants on rhizogenesis in stem cuttings of *Cotinus coggygria*. *Physiologiae Plantarum*. 27(4): 417-428.

- Pavone, A. R., Avilán, L., & Herrera, L. (2008). Efecto del despuntado, poda y paclobutrazol, sobre la brotación vegetativa y reproductiva de cuatro cultivares de mango. *Revista Agronomía Tropical*. 58(4): 351–356.
- Perry, J.T. (1991). The pines of Mexico and America Central. Timber Pres. Portland, Oregon. 167. pp.
- Rodríguez, B. A., Vargas, M, C., Buonamici, A. F., & Vendramin, G. G. (2009). Genetic diversity and phylogeographic analysis of *Pinus leiophylla*: a post-glacial range expansion. *Journal of Biogeography*. 36: 1807-1820.

3. OBJETIVO GENERAL

Incrementar la producción y enraizamiento de mini-esquejes (brotes) de la progenie de tres arboles selectos de *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham.

3.1 Objetivos específicos

- Analizar el efecto de la fertilización en el incremento de brotes (mini-esquejes) en plantas de tres familias selectas de *P. leiophylla*.
- Evaluar el efecto de la etiolación, sombra, fertilización y dosis de ácido indolbutírico (AIB) en el enraizamiento de mini-esquejes procedentes de la progenie de tres familias de *P. leiophylla*.
- Analizar el crecimiento y morfología de la plantas de *P. leiophylla* producidas vegetativamente.

4. HIPÓTESIS

La fertilización incrementara la producción de brotes en la progenie de 3 familias de *P. leiophylla* de un huerto semillero sexual.

Los brotes fertilizados y tratados bajo sombra al 50% tendrán mayores porcentajes de enraizamiento en comparación con las que no fueron tratadas.

Los mini-esquejes obtenidos de plantas etioladas tendrán mayor porcentaje de enraizamiento en comparación con las que no fueron etioladas.

CAPITULO I. MANEJO DE SETOS DE PROGENIES DE *Pinus leiophylla* PARA AMPLIFICAR LA PRODUCCIÓN DE BROTES (MINI-ESQUEJES)

RESUMEN

La propagación vegetativa por mini-estacas demanda alta producción de brotes adventicios para estacas; en coníferas, árboles maduros producen pocos brotes. El manejo de plantas donadoras, procedentes de semilla de árboles selectos, a través de podas y fertilización podría facilitar e incrementar la producción de estacas. En este trabajo se evaluaron: el efecto de la fertilización en la fenología de yemas adventicias y la producción y crecimiento de brotes en plantas podadas, procedentes de la progenie de tres arboles selectos de un huerto semillero sexual de *P. leiophylla*. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con dos factores a probar: fertilización (con y sin) y familia (F51, F101, F105); generando 6 tratamientos con 12 réplicas, usando un total de 72 plantas. Durante el experimento se monitoreo la fenología de yema y al final se registró el número (NB) y longitud (LB) de brotes, así como el diámetro al cuello de la raíz (DCR) de planta donadora. La fertilización acelero la fenología de yema y aparición de brotes a lo largo del tallo; incrementó la producción de NB en más de 30%; y la LB en más de 20%, en relación a las no fertilizadas. La fertilización amplifica la producción de NB.

Palabras clave: Clonación, propagación vegetativa, fertilización, yemas adventicias, coníferas.

ABSTRACT

Vegetative propagation by mini-cuttings demands high production of adventitious shoots for cuttings; in conifers, mature trees produce few shoots. Donor plants management, stock plant from seed of selected trees, through pruning and fertilization could facilitate and increase the production of cuttings. This study evaluated the effect of fertilization on the phenology of adventitious buds, production and growth of shoots in pruned plants from the progeny of three select trees of a sexual orchard of *P. leiophylla*. The experiment was set under a completely randomized design with two factors to try: fertilization (with and without) and family (F51, F101, F105); generating six treatments with 12 replicates, using a total of 72 plants. During the experiment bud phenology was monitored and at the end the number (NB) and length (LB) of shoots and the diameter at root collar (DCR) of donor plant was recorded.

Fertilization accelerated the bud phenology and outbreaks along the stem; increase production of NB by more than 30%; and LB in more than 20% compared to unfertilized. Fertilization amplified NB production.

Key words: Cloning, vegetative propagation fertilization, adventitious buds, conifers.

1.1 INTRODUCCIÓN

En silvicultura clonal, la técnica de mini-esquejes ha resultado ideal para propagar genotipos con características deseables, debido a su bajo costo y menor tiempo para producción de planta (Sánchez, Ortega, Majada, Txarterina & Dunabertia, 2008). En varios países la técnica ya ha sido implementada dentro de los esquemas de mejoramiento genético forestal.

Clonar y propagar arboles selectos es complicado, la alternativa ha sido obtener setos a partir de planta progenie, donde es relativamente fácil obtener mini-esquejes con mayor capacidad para enraizar. Aunque por esta vía no se clona el genotipo del árbol selecto en su totalidad, solo se tiene parte de éste y se supone la existencia de cierto nivel de heredabilidad. Además, se pueden desarrollar líneas clonales con caracteres de interés. A través de la producción de mini-esquejes, progenie de genotipos selectos tolerantes a sequía y salinidad detectados en un huerto semillero sexual de *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. podrían multiplicarse; para proporcionar en el corto plazo, planta de calidad requerida para reforestar y restaurar sitios degradados. Para lo cual es necesario que la planta donadora o seto produzca gran cantidad de brotes para generar los mini-esquejes.

La inducción y obtención de brotes para mini-esquejes se realiza mediante el manejo de los setos a través de podas programadas. La aplicación de poda constante da lugar a la formación de los setos, al estimular el crecimiento y mantener el estado juvenil de los mini-esquejes, condición deseable para su enraizamiento. Sin embargo, en algunas especies las podas no son suficientes para producir el número de mini-esquejes

requerido para la producción masiva de planta con caracteres deseables (Pavone, Avilan & Herrera, 2008). Por lo que es necesario implementar nuevas prácticas adicionales en el manejo del seto para amplificar la producción de brotes.

Además de la poda, la fertilización de la planta donadora podría amplificar la producción de brotes. Varios estudios, en especies arbóreas, han señalado que los carbohidratos son responsables de incentivar el crecimiento y proliferación de brotes (Del Tredici, 2001). Por otro lado, se sabe que el suministro de nutrientes vía fertilización incrementa el contenido de carbohidratos en la planta, ya que el efecto estimulador del nitrógeno, fósforo y potasio (N, P y K) en el contenido de clorofila *a* y *b* incrementa la eficiencia fotosintética que se refleja en el contenido de carbohidratos y proteínas solubles totales en tejidos (Latsague, Saez, & Mora, 2014). Además, algunos elementos como el nitrógeno están involucrados en el crecimiento a través de la expansión celular (Lázaro et al., 2011). En setos de *P. taeda* L. se comprobó que la fertilización con nitrógeno, incrementa los niveles de carbohidratos y mejora la producción en número de brotes (Rowe, Blazich, & Raper, 2002).

Por lo tanto, bajo la hipótesis de que la fertilización amplificará la producción de brotes en plantas podadas, en este trabajo se planteó como objetivo evaluar el efecto de la fertilización en la producción y crecimiento de brotes en plántulas podadas de siete meses de edad procedentes de tres familias de un huerto semillero sexual de *P. leiophylla*.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Sitio experimental

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del vivero adjunto al huerto semillero sexual de *P. leiophylla* localizado en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, municipio de Texcoco, Estado de México; con coordenadas geográficas 19° 27' 34.8" LN y 98° 54' 15.8" LO, a una altitud aproximada de 2250 m.

1.2.2 Condiciones de la planta

En enero del 2014, semillas procedentes de tres arboles selectos (51, 101, 105) del huerto semillero, seleccionadas por su crecimiento, calidad en producción de semilla y tolerancia a sequía y plagas (Gómez, Ramírez, Jasso, & López, 2010; Castelán, Jiménez, López, Campos, & Vargas, 2014), fueron germinadas en contenedores individuales con capacidad de 310 cm³ con sustrato de turba-agrolita-tierra de monte con relación a 3:1:1, las plantas fueron crecidas bajo condiciones de invernadero.

Cuando las plantas tuvieron nueve meses de edad (octubre 2014), fueron trasplantadas a tubetes individuales de polietileno con capacidad de 1L, con sustrato de turba-agrolita-vermiculita-tierra de monte con una proporción de 7:1:1:1, respectivamente; mezcla usada en la producción de planta del vivero forestal del Colegio de Postgraduados.

1.2.3 Diseño experimental y tratamientos

El experimento se estableció con un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 2, tres familias (51, 101, 105) y dos niveles de fertilización (con y sin), en total 6 tratamientos con 12 réplicas cada uno; por lo que se usaron 72 plantas en el experimento. Las plantas de cada familia se dividieron en dos grupos, cada grupo con 12 plantas. El primer grupo fue fertilizado por inmersión durante 10 min, dos veces por semana, con una solución de fertilizante comercial peters® (N-P-K, 20-20-20) de 2 g L⁻¹ disuelto en agua destilada con pH de 5.5; mientras el otro grupo (testigo) solo se regó con agua destilada. El tratamiento se mantuvo por siete meses. Para evitar la acumulación de sales en el sustrato, por la fertilización, cada 15 días todas las plantas se regaban con abundante agua destilada.

Entre el periodo de fertilización, 12 de noviembre de 2014, los tallos principales de las plantas con y sin tratamiento fueron podados a los 20 cm de altura de la base del tallo al ápice y en sus ramas basales a 1 cm del ápice para inducir la formación de nuevos brotes.

1.2.4 Variables evaluadas

La fenología del brote, comprendido como su iniciación, desarrollo y crecimiento, fueron monitoreados cada semana, a través de varias fases (Figura 1).

Al final del experimento en cada planta donadora o seto también se registró: 1) el diámetro a la base de la raíz (DCR), el cual se midió con un vernier digital (± 0.01 mm); 2)

el número de brotes (NB) producidos, a través del tallo y ramas; y 3) la longitud de brotes (LB), mediante una regla graduada ($\pm 1\text{mm}$).



Figura 1. Fases consideradas para evaluar la fenología de los brotes en plantas de *P. leiophylla* tratadas con fertilizante: a) Fase 0: sin yema, b) Fase 0.5: aparición de yemas color marrón, c) Fase 1: alargamiento de las yemas, d) 1.5: rompimiento de las yemas en coloración verde ≤ 1 cm, e) 2: crecimiento de brotes ≤ 3 cm y f) 2.5: crecimiento de brotes ≤ 5.5 cm.

1.2.5 Análisis de datos y modelo estadístico

Previo a los análisis, se comprobó la normalidad de los datos y el análisis de varianza se realizó mediante el modelo lineal (1) con el procedimiento GLM del programa SAS (SAS

Institute, 2002). La diferencia entre medias se llevó a cabo mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

$$y_{ij} = \mu + FA_i + FE_j + FA FE_{ij} + \varepsilon_{ij} \quad (1)$$

Donde. y_{ij} = Valor de la variable observada de la del i – esima familia con la j – esima dosis de fertilización. μ = media. FA_i = Efecto de la i – esima familia; FE_j = Efecto del j – esima dosis de fertilización; $FA FE_{ij}$ = Efecto de la interacción de la i – esima familia y la del j – esima dosis de fertilización; ε_{ij} = Efecto del error.

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Crecimiento en DCR de planta donadora

La fertilización influyó de manera significativa y positiva ($P \leq 0.05$) en el DCR y NB de las plantas, mientras que el efecto de la familia solo fue significativo para LB (Cuadro 1).

Cuadro 1. Valores de significancia *P* del análisis de varianza de los efectos de tratamientos sobre las variables evaluadas en el experimento en plántulas de *P. leiophylla*.

Fuente de variación	G.L.	DCR	NB	LB
FE	1	0.0452*	0.0001*	0.2508
FA	2	0.4950	0.7975	0.0316*
FE*FA	2	0.5915	0.1073	0.1073

* Con diferencias significativas ($P \leq 0.05$). G.L. Grados de libertad, FE: Tratamiento de fertilización, FA: Familia. DCR: Diámetro al cuello de la raíz (mm), NB: Número de brotes, LB: Longitud promedio del brote (cm).

El fertilizante incrementó el DCR de las plantas en 10%, respecto a su testigo (Figura 2). Incremento que fue similar entre las plantas de las tres familias. Se sabe que planta forestal fertilizada tendrá mayor capacidad de almacenar carbohidratos, particularmente en la región del cuello de raíz donde se observan mayor crecimiento en DCR (Cetina et al. 2001). En nuestro estudio no se analizó la concentración de carbohidratos, pero se podría asumir que planta con mayor DCR, por efecto del fertilizante, contaría con mayor reserva de nutrientes, requeridos para la producción de brotes.

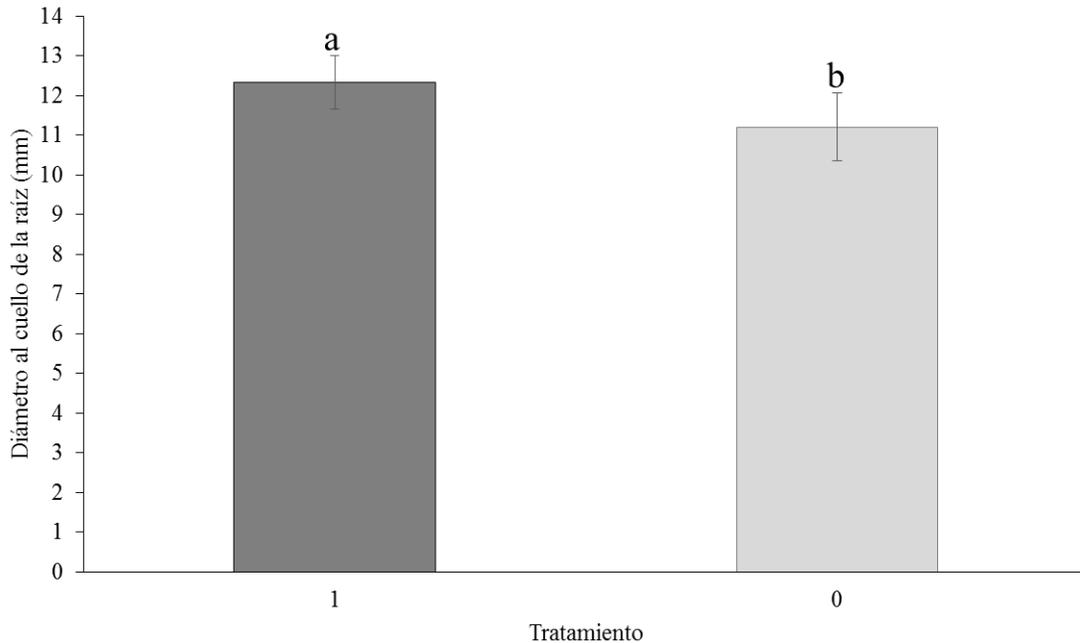


Figura 2. Efecto de la fertilización en el diámetro al cuello de raíz (DCR) en plantas de *P. leiophylla*. 1: Plantas fertilizadas, 0: Plantas sin fertilización. Valores promedio (n=36) \pm error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

1.3.2 Fenología del brote

La fertilización afectó el proceso fenológico de yemas en plantas podadas de *P. leiophylla*; ya que después de 14 días de la poda, en las plantas fertilizadas las yemas aparecieron e iniciaron su desarrollo y crecimiento; mientras que en las plantas no fertilizadas el evento se inició hasta siete días después, cuando las plantas tenían aproximadamente 11 meses de edad (Figura 3). De la misma manera, los brotes producidos en plantas fertilizadas alcanzaron la fase 2.5 a los 112 días, no así en las no fertilizadas que lo hicieron a los 14 días más para alcanzarla, cuando las plantas tenían aproximadamente 1 año y 1 mes de edad. Respuesta similar se ha observado en estudios con plantas de *Pseudotsuga* sp., donde la fertilización adelantó las fases

fenológicas de la yema, incluyendo su rompimiento (Acevedo, Vargas, López, & Velázquez, 2006). En nuestro estudio la diferencia encontrada entre tratamientos resulta importante para acelerar la fenología y producción de brotes.

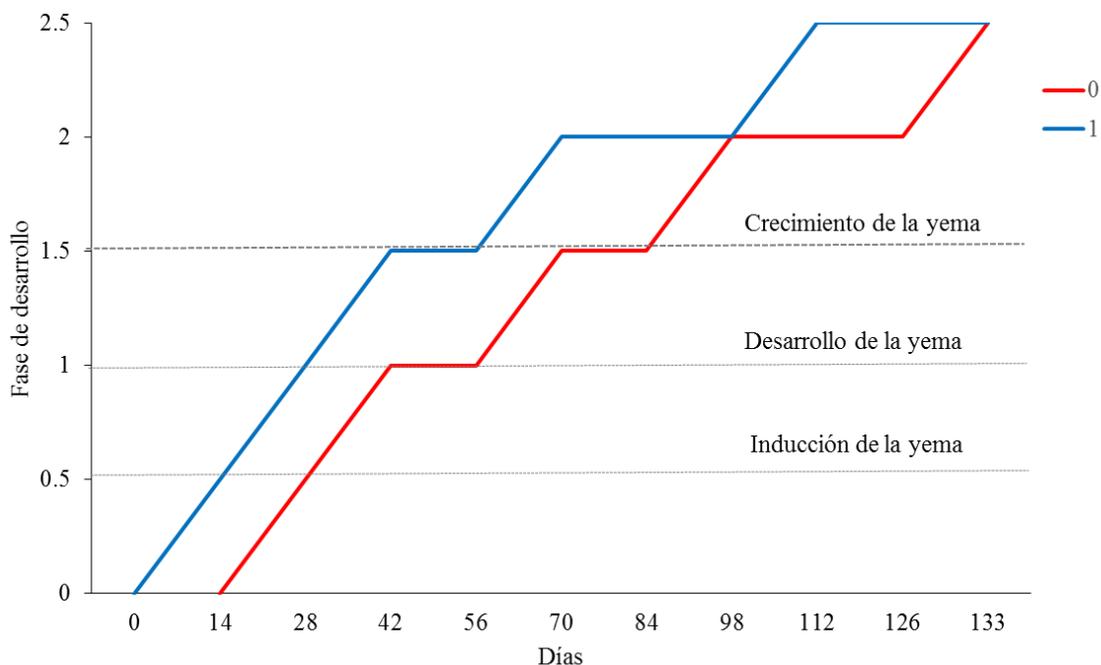


Figura 3. Fenología del brote en plantas de *P. leiophylla* fertilizadas (1) y sin fertilización (0). a) Fase 0: sin yema, b) Fase 0.5: aparición de yemas color marrón, c) Fase 1: alargamiento de las yemas, d) 1.5: rompimiento de las yemas en coloración verde ≤ 1 cm, e) 2: crecimiento de brotes ≤ 3 cm y f) 2.5: crecimiento de brotes ≤ 5.5 cm.

1.3.3 Producción de brotes

Las plantas de *P. leiophylla* tratadas con fertilizante tuvieron 30% más brotes que las no fertilizadas (Figura 4), aunque entre familias la producción de los brotes no varió. Se tiene conocimiento que la fertilización con nitrógeno, incrementa los niveles de carbohidratos en los tejidos (Navarro, Vargas, Gómez, Ruiz, & Sánchez, 2013), macronutriente necesario para amplificar la estimulación de yemas adventicias latentes en especies

arbóreas con alta capacidad de rebrote (Del Tredici, 2001). Además, estudios de fertilización en setos de *Pinus radiata* D. Don señalan que el nivel de nitrógeno, acumulado en tejidos de plantas tratadas con fertilizantes, es responsable de incrementar el número de brotes (Hernández & Rubilar, 2012). Por otro lado, estos resultados evidencian y remarcan la capacidad de *P. leiophylla* para desarrollar brotes y amplificar la producción de mini-esquejes para la propagación masiva de genotipos con caracteres deseables (Figura 4); ya que en contraste con otros pinos como *P. radiata* y *P. jaliscana*, en promedio, solo se obtienen entre 9 y 8 brotes por planta (seto), respectivamente (Aparicio, Rebolledo, & Cruz, 2006; Hernández & Rubilar, 2012).

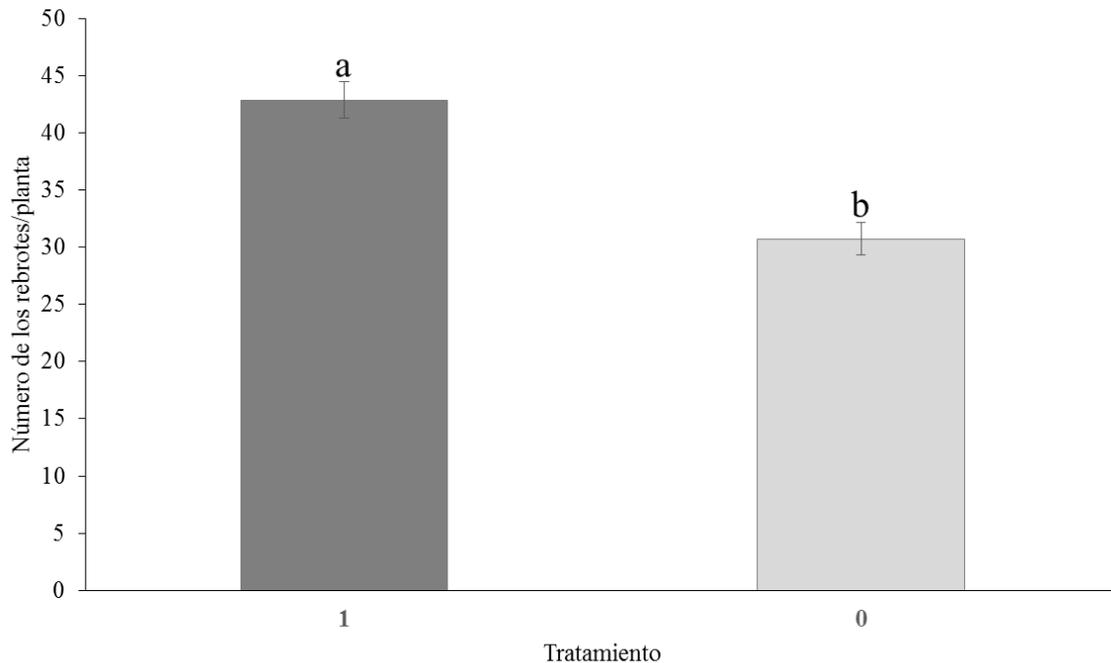


Figura 4. Efecto de la fertilización para el número de brotes de plantas de *P. leiophylla*, por tratamiento. 1: Plantas fertilizadas, 0: Plantas sin fertilización. Valores promedio ($n=36$) \pm error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

1.3.4 Efecto de la fertilización sobre el crecimiento de brotes

En la longitud de los rebrotes, no se encontraron diferencias significativas entre las plantas fertilizadas y las plantas testigo. Sin embargo, entre familias si hubo diferencias ($P \leq 0.05$), los rebrotes de la familia 105 incrementaron su crecimiento en longitud en más del 20% en relación con las otras dos familias (Figura 5). En algunas investigaciones con coníferas, se ha observado que el crecimiento del brote terminal depende más del genotipo que de la fertilización (Acevedo et al., 2006). Aunque cuando se incrementan las dosis de fertilizante, particularmente la de nitrógeno, se ha estimulado considerablemente el crecimiento de los brotes. La presencia de N en tejido promueve la expansión y crecimiento celular en consecuencia al incremento de agua en el protoplasma (Monsalve, Escobar, Acevedo & Sánchez, 2009). En plantas de *P. radiata*, los brotes incrementaron su longitud hasta en 40% cuando las plantas fueron tratadas con 400 mg L^{-1} de nitrógeno (Hernández & Rubilar, 2012); mientras que en nuestro estudio, la concentración de nitrógeno presente en el fertilizante usado fue de 190 mg L^{-1} . Aun así el tamaño alcanzado en los brotes es suficiente para obtener los mini-esquejes a enraizar, pero en futuros estudios se recomienda probar niveles altos de nitrógeno o diferentes proporciones con referencia a P y K para buscar mejorar el tamaño de los brotes hasta ahora alcanzados en plantas de *P. leiophylla*.

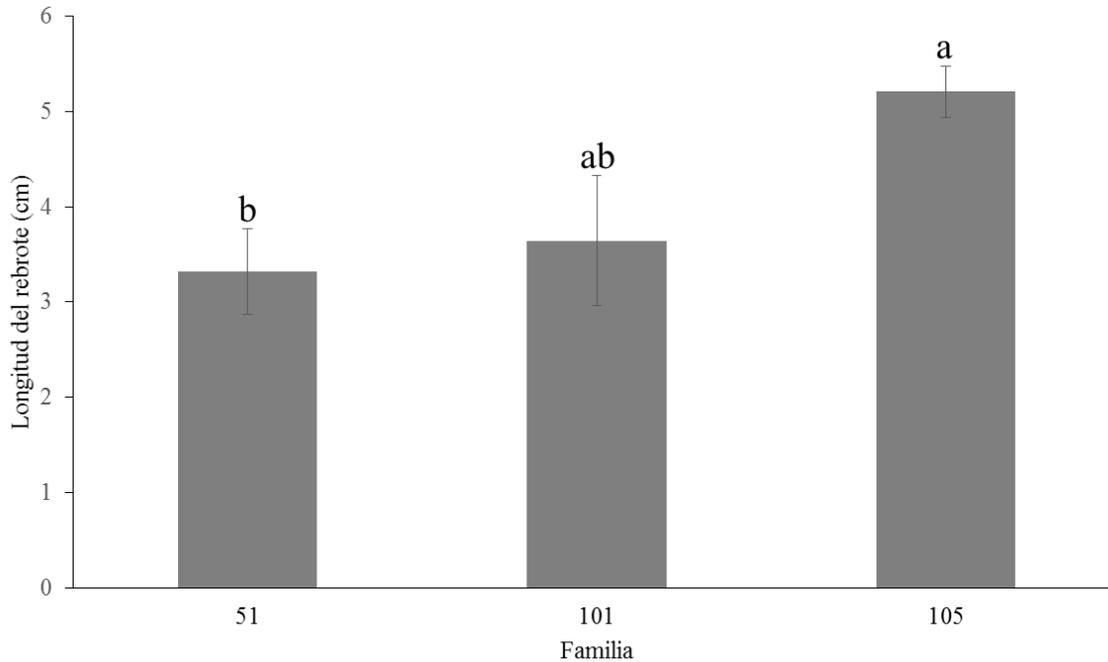


Figura 5. Efecto de la familia para la longitud de los brotes en plantas de *P. leiophylla* por familia. Valores promedio (n=12) \pm error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

1.4 CONCLUSIONES

La fertilización incrementó en un 10% el DCR de las plantas donadoras o setos de manera similar en las tres familias probadas de *P. leiophylla*. La fenología y crecimiento del brote se aceleró, en plantas de las tres familias, por el tratamiento de fertilización por un lapso aproximado de 7 días, con respecto a las plantas testigo. La fertilización amplificó la producción del NB en más de 30% en plantas podadas de las tres familias. El efecto de la fertilización no mostró interacción con la familia para la producción de NB. Por lo tanto, además de la poda de la planta donante o seto se recomienda la aplicación de fertilizantes para amplificar la producción de brotes, para acelerar los procesos de activación, desarrollo y crecimiento del brote.

1.5 LITERATURA CITADA

- Acevedo, R. R., Vargas, H. J., López, U. J., & Velázquez, M. J. (2006). Efecto de la procedencia geográfica y de la fertilización en la fenología del brote terminal en plántulas de *Pseudotsuga* sp. *Revista Agrociencia*. 40: 125–137.
- Aparicio, R. A., Rebolledo, C. V., & Cruz, M. H. (2006). Multiplicación clonal de *Pinus jaliscana* Pérez de la rosa a través de la técnica de enraizamiento de estacas. *Foresta Veracruzana*. 8 (2):19–22.
- Castelán, M. N., Jiménez, C. M., López, D. H., Campos, G. H., & Vargas, H. J. (2014). Familial variation in *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. seedlings in response to drought: water and osmotic potential. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 21(3): 295–306.
- Cetina, A. V. M., Ortega, M. L., González, H. V., Vargas, H. J., Colinas, M. T., & Villegas, M. A. (2001). Fotosíntesis y contenido de carbohidratos de *Pinus gregii* engelm. en respuesta a la poda y al régimen de riego en vivero. *Revista Agrociencia*. 35 (6): 599–607.
- Del Tredici, P. (2001). Sprouting in temperate trees: A morphological and ecological. *The Botánica Review*. 67(2): 121-137.
- Gómez, J. D., Ramírez, H. C., Jasso, M. J., & López, U. J. (2010). Variación en características reproductivas y germinación de semilla de *Pinus leiophylla*. *Revista Fitotecnia*. 33(4):297-309.
- Hernández, A., & Rubilar, R. (2012). Efecto de la fertilización nitrogenada y fosforada en el desarrollo y fenología de brotes de setos de *Pinus radiata*. *Revista Bosque*. 33(1): 53–61.

- Latsague, M., Saez, P., & Mora, M. (2014). Efecto de la fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio, sobre el contenido foliar de carbohidratos, proteínas y pigmentos fotosintéticos en plantas de *Berberidopsis corallina* Hook. F. *Revista Gayana Botanica*. 71(1):37–42.
- Lázaro, D. M., Velázquez, M. J., Vargas, H. J., Gómez, G. H., Álvarez, S. M., & López, L. M. A. (2012). Fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio en un latizal de *Pinus patula* Schl. et Cham. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 18(1): 33–42.
- Monsalve, J. R., Escobar, M., Acevedo, M., & Sánchez, R. (2009). Efecto de la concentración de nitrógeno sobre atributos morfológicos, potencial de crecimiento radical y estatus nutricional en plantas de *Eucalyptus globulus* producidas a raíz cubierta. *Revista Bosque*. 30(2): 88–94.
- Navarro, S. J., Vargas, H. J., Gómez, G. A., Ruiz, P. L., & Sánchez, G. P. (2013). Morfología, biomasa y contenido nutrimental en *Abies religiosa* con regímenes diferentes de fertilización en vivero. *Revista Agrociencia*. 47 (7):707–721.
- Pavone, A. R., Avilán, L., & Herrera, L. (2008). Efecto del despuntado, poda y paclobutrazol, sobre la brotación vegetativa y reproductiva de cuatro cultivares de mango. *Revista Agronomía Tropical*. 58(4): 351–356.
- Rowe, D., Blazich, F., & Raper, C. (2002). Nitrogen nutrition of hedged stock plants of *Pinus taeda* L. Tissue nitrogen concentrations and carbohydrate status. *New Forest*. 24: 39–51.
- Sánchez, Z. J., Ortega, L. U., Majada, G. J., Txarterina, U. K., & Duñabeitia A. M. (2008). Optimización de la propagación vegetativa por estaquillado de genotipos de

interés comercial en *Pinus radiata*. *Sociedad Española de Ciencias Forestales*. 28:
201–205.

Statistical Analysis System. (Version 9.00). (2002). SAS/STAT Computer Software.
SAS Institute Inc. Cary.

CAPITULO II. ENRAIZAMIENTO DE MINI-ESQUEJES DE PROGENIES DE *Pinus leiophylla*, BAJO TRATAMIENTOS DE FERTILIZACIÓN Y SOMBRA

RESUMEN

La propagación vegetativa es importante para obtener planta genéticamente superior de gran importancia para programas de mejoramiento genético, en plantaciones comerciales y huertos semilleros clonales. Una de las principales técnicas es el enraizado por mini-esquejes; la obtención de mini-esquejes vigorosos y de calidad requiere el manejo en vivero de la planta donadora (seto), aplicar fertilización, incrementa los niveles de carbohidratos de reserva que serán utilizados para el enraizamiento de los mini-esquejes. El sombreado de las plantas donadoras (seto) permite cierto grado de juvenilidad de los mini-esquejes, dando lugar a emerger los primordios radicales. Aplicar este tipo de propagación *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. especie de amplia distribución natural en México, rápido crecimiento, altamente recomendada para restauración y reforestación de sitios degradados permitirá clonar la progenie de árboles selectos. En este trabajo se evaluaron los porcentajes de enraizamiento, numero de raíces de los mini-esquejes de plantas donadoras tratadas bajo tratamientos de sombra, y el crecimiento en altura y diámetro de las plántulas procedentes de los mini-esquejes de la progenie de los tres arboles selectos de un huerto semillero sexual de *P. leiophylla*. El experimento se estableció bajo con arreglo factorial 3x2x2: tres familias (51, 101, 105), fertilización (con y sin) y dos tratamientos de sombra (50% y expuesta a luz natural), generando 12 tratamientos. Cada tratamiento con 4 repeticiones y 10 réplicas (mini-

esquejes). Los resultados arrojan los mejores porcentajes en la familia 101; en cuanto al número de raíces no se encontraron diferencias significativas; tampoco en la altura y diámetro de las plántulas. Se concluye que el factor sombra y fertilización no influye en el número de raíces ni en el crecimiento de las plantas obtenidas de los mini-esquejes de la progenie de *P. leiophylla*.

Palabras clave: clonación, fertilización, *Pinus leiophylla*, sombra al 50%, mini-esquejes.

ABSTRACT

Vegetative propagation is important to obtain genetically superior plant of great importance for breeding programs in commercial plantations and clonal seed orchards. One of the main techniques is rooted by mini-cuttings; obtaining mini-cuttings and vigorous quality nursery management requires the donor plant (hedge), apply fertilizer, increases levels of carbohydrate reserves to be used for rooting of mini-cuttings. Shading of the donor plants (hedge) allows a degree of juvenility of mini-cuttings, for a better root primordia emerge. Applying this type of propagation *Pinus leiophylla* Schiede ex Schldl. & Cham. has a wide natural distribution in Mexico, rapidly growing, highly recommended for restoration and reforestation of degraded sites allow you to clone the progeny of selected trees. In this work the percentages of rooting, number of roots of mini-cuttings donor plants treated under shade treatments, and growth in height and diameter of seedlings from the mini-cuttings from the progeny of the three trees were evaluated choicest sexual seed orchard of *P. leiophylla*. The experiment was established under 3x2x2 factorial arrangement with: three families (51, 101, 105), fertilization (with and without) and two shade treatments (50% and exposed to natural light), generating 12 treatments. Each treatment with 4 replicates and 10 replications (mini-cuttings). The results show the best percentages in the family 101; in the number of roots, no significant differences were found; either in the height and diameter of seedlings. It is concluded that the shade and fertilization factor does not affect the number of roots and growth of the plants obtained from the mini-cuttings from the progeny of *P. leiophylla*.

Key words: cloning, fertilization, *Pinus leiophylla*, shade 50%, mini-cuttings.

2.1 INTRODUCCIÓN

La propagación vegetativa, es la producción de planta con características genéticas idénticas a la planta madre, permitiendo la multiplicación de genotipos deseables, para aumentar la ganancia genética (Sánchez, Ortega, Majada, Txarterina, & Duñabeitia, 2008); siendo de gran importancia en programas de mejoramiento genético forestal, utilizado ampliamente para preservar genotipos de bancos clonales y establecer huertos semilleros clonales, obteniendo mayores ganancias genéticas en el menor tiempo posible (Zobel & Talbert, 1988; Mesen, 1998).

Las técnicas usadas para la propagación vegetativa de especies forestales son enraizamiento por mini-esquejes, injerto y cultivo *in-vitro* (Aparicio, Juárez, & Sánchez, 2014). El enraizamiento de mini-esquejes para la clonación y propagación masiva de genotipos deseables, se logra obteniendo mini-esquejes vigorosos y de calidad, obteniendo planta en un menor lapso de tiempo (Miranda, Aloisio, & Campos, 2006; Cuevas, Jiménez, Jasso, Pérez, López, & Villegas, 2014). Para obtener éxito en el enraizado se debe considerar el tipo de mini-esqueje (madera suave o leñosa), contenido de reservas (carbohidratos), edad fisiológica de la parte del árbol de donde se extraerá el mini-esqueje, así como la dosis del enraizador a aplicar, con la finalidad de favorecer el enraizado (Alarcon & Ferrera- Cerrato, 1999).

Al aplicar técnicas de fertilización en las plantas donantes, se incrementan los niveles de carbohidratos de reserva disponibles, presentes en los tallos y hojas de las plantas, acelerando su crecimiento y mejorando el enraizamiento en los mini-esquejes (Laskowski, 2014; Monsalve, Escobar, Acevedo, Sánchez, Coopman, 2009).

Es importante considerar que la reducción de la intensidad de la luz con malla sombra al 50% en setos de *Cotinus coggygria*, tiene efectos positivos en el enraizamiento de mini-esquejes, al presentar cambios en la anatomía del mini-esqueje, considerando un desarrollo del esclerénquima más delgado, ayudando a que los primordios radicales se desarrollen para formar raíces (Pacholczak, Szydło, & Jukaszewska, 2005).

A través de la producción de mini-esquejes, en la progenie de genotipos selectos tolerantes a sequía y salinidad detectados en un huerto semillero sexual de *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. se podrá lograr su multiplicación masiva para proporcionar, en el corto plazo, planta de calidad requerida para reforestar y restaurar sitios degradados (Gómez, Ramírez, Jasso, & López, 2010; Castelán, Jiménez, López, Campos, & Vargas, 2014).

Sin embargo, es difícil tener éxito en el enraizamiento de mini-esquejes del género *Pinus* ya que resultados de investigaciones previas para el enraizamiento de mini-esquejes de *P. leiophylla*, ha reportado lograr 45% de enraizado probando diferentes tipos de sustrato, dosis de ácido indolbutírico (AIB) y la posición del mini-esqueje en la planta donadora o seto (Cuevas, et al., 2014).

Por lo tanto, bajo la hipótesis de que la fertilización induce la aparición y crecimiento de las raíces adventicias y el sombreado hace cambios en la anatomía del mini-esqueje se planteó el objetivo de analizar el efecto de la fertilización y el sombreado en el enraizamiento de mini-esquejes, procedentes de la progenie de tres familias selectas establecidas en un huerto semillero sexual de *P. leiophylla*.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Sitio experimental

El experimento se llevó a cabo en el invernadero y vivero forestal del huerto semillero sexual de *Pinus leiophylla*, localizado en las instalaciones del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, ubicado en el municipio de Texcoco, Estado de México con coordenadas geográficas 19° 27' 34.8" LN y 98° 54' 15.8" LO, a una altitud aproximada de 2250 m.

2.2.2 Material vegetal

En la primavera del 2014, semilla procedentes de tres familias (51, 101, 105) del huerto semillero sexual de *P. leiophylla*, seleccionadas por su rápido crecimiento, fuste recto y tolerancia a factores bióticos y abióticos, fueron germinadas. Las plántulas producidas crecieron en tubetes de 310 ml conteniendo como sustrato una mezcla de turba-agrolita-tierra de monte en proporción de 3:1:1. Cuando las plantas tuvieron 12 meses de edad se trasplantaron a tubetes de 1L con una mezcla de turba, agrolita, vermiculita, tierra de monte (7:1:1:1) como sustrato y fertilizante de lenta liberación (osmocote® 7g L⁻¹) adicionado.

2.2.3 Tratamientos y diseño experimental

2.2.3.1 Sombra y fertilización

En verano del 2015, 34 plantas fueron sometidas a tratamientos de sombra y 34 plantas testigo estuvieron en condiciones de luz natural durante el día, mientras que las tratadas bajo sombra se establecieron en una cámara, de 1 m de ancho x 1.5 m de largo x 1 m de alto, cubierta con maya sombra al 50%. Durante el tratamiento, 17 plantas de los tratamientos de sombra y testigo, fueron sometidas a tratamientos de fertilización (con y sin), fertilizadas dos veces por semana, con una solución de 2g L⁻¹ de fertilizante comercial peters® (N-P-K, 20-20-20) con pH de 5.5, mientras que el otro grupo solo fue regado con agua. Para evitar la acumulación de sales en el sustrato, por la fertilización, cada 15 días todas las plantas se regaban con abundante agua.

2.2.3.2 Obtención de mini-esquejes

Después de 92 días de estar en condiciones de sombra, las plantas fueron sustraídas aleatoriamente de la cámara. Enseguida, ramas de cada planta fueron podadas para obtener mini-esquejes de 6 cm de longitud; a los cuales se les removió una tercera parte de las acículas para evitar transpiración excesiva, e inmediatamente se colocaron en una solución de captan 2 g L⁻¹, donde permanecieron por 5 min. Los mini-esquejes fueron tratados con Ácido indolbutírico (AIB) (3000 ppm) de forma líquida y se establecieron en cámaras de enraizado (70 cm de largo x 60 cm de ancho x 15 cm de alto) llenas con agrolita, previamente humedecida con una solución de captan 2g L⁻¹. Durante el

experimento la temperatura registrada en las cámaras fue de entre 18.8°C y 31.8°C y la humedad relativa entre 75.1% y 90.5%.

El experimento tuvo un diseño al azar con arreglo factorial 3x2x2: familias (51, 101,105), sombra (con y sin) y fertilización (con y sin), generando 12 tratamientos con 4 repeticiones (Cuadro 2). Cada tratamiento con 10 réplicas (480 mini-esquejes en total).

Cuadro 2. Tratamientos de fertilización y sombra realizados a plantas procedentes de tres familias de *P. leiophylla* de 17 meses de edad.

Familia	Fertilización	Sombra
51	●	●
51	●	○
51	○	●
51	○	○
101	●	●
101	●	○
101	○	●
101	○	○
105	●	●
105	●	○
105	○	●
105	○	○

●: con fertilización o sombra. ○: sin fertilización y sombra

2.2.4 Trasplante de los mini-esquejes

Una vez obtenidos los mini-esquejes enraizados, fueron trasplantados a tubetes de plástico con capacidad de 1L, con un sustrato de turba-agrolita-vermiculita- tierra de

monte en proporción de 7:1:1:1 y fertilizante de lenta absorción (Osmocote 7g L⁻¹). Las plántulas fueron fertilizadas con una solución de 2g L⁻¹ de fertilizante inicial 10-30-20 (N-P-K), fertilizadas 2 veces a la semana, para evitar la acumulación de sales, las plántulas fueron lavadas con abundante agua cada 2 semanas.

2.2.5 Variables a evaluar

A los 103 días de establecido el experimento se extrajeron los mini-esquejes, considerando vivos los que tenían raíz y callo, y muertos los que estaban secos, en los mini-esquejes vivos, se evaluaron sus características morfológicas como son la altura, esta se midió con una regla graduada ($\pm 1\text{mm}$) y su diámetro a la base del tallo, el cual se midió con un vernier digital ($\pm 0.01\text{mm}$), Se consideró un mini- esqueje enraizado cuando presentaba al menos una raíz principal de ≥ 0.5 cm de longitud. A los mini-esquejes enraizados se les contaron el número de raíces de primer (RP) y segundo orden (RS) y se les midió la longitud de la raíz más larga (LR).

2.2.6 Crecimiento de las plantas de *P. leiophylla*

Después de 34 días de ser extraído el mini-esqueje de la cámara de enraizamiento, se evaluó cada mes, la altura del mini-esqueje con una regla graduada ($\pm 1\text{mm}$); y su diámetro a la base del tallo, el cual se midió con un vernier digital ($\pm 0.01\text{mm}$) las mediciones duró 4 meses (Enero-Abril).

2.2.7 Análisis de datos

Previo a los análisis, porcentajes de enraizamiento, callo y supervivencia fueron normalizados con la función arcoseno y usados para el análisis de varianza de acuerdo al modelo lineal (2) y realizado con el procedimiento GLM en el programa SAS (SAS Institute, 2002). La diferencia entre medias se llevó a cabo mediante la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$). En cuanto al crecimiento de las plantas provenientes de mini-esquejes se comprobó la normalidad de los datos y realizó el análisis de varianza de acuerdo con el modelo lineal (2) mediante el procedimiento GLM del programa SAS (SAS Institute, 2002). La diferencia entre medias se llevó a cabo mediante la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$)

2.2.8 Modelo estadístico

$$y_{ijkl} = \mu + Fam_i + Fer_j + Som_k + Fam * Fer_{ij} + Fam * Som_{ik} + Fer * Som_{jk} + Fam * Fer * Som_{ijk} + \varepsilon_{ijkl} \quad (2)$$

Donde: y_{ijk} = Valor de la variable observada de la i – esima familia, con la j – esima fertilización en el k - esimo sombreado. μ = media general. Fam_i = efecto de la i – esima familia (51-101-105). Fer_j = efecto de la j – esima fertilización. Som_k = efecto del k - esimo sombreado. $Fam * Fer_{ij}$ = efecto de la interacción de la i – esima familia con la j – esima fertilización. $Fam * Som_{ik}$ = efecto de la interacción de la i – esima familia con la k - esimo sombreado. $Fer * Som_{jk}$ = efecto de la interacción j – esima fertilización con el k - esimo sombreado.

sombreado. $Fam * Fer * Som_{ijk}$ = efecto de la interacción de la i – esima familia con la j – esima fertilización, el k – esimo sombreado. ε_{ijk} = Efecto del error.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Efecto de la familia, enraizado y sombra

Ninguno de los tres factores probados demostró un efecto significativo en el enraizamiento, inducción de callo y supervivencia de mini-esquejes (Cuadro 3). Sin embargo en cuanto al enraizamiento por familia, alguna de ellas sobresale en cada uno de los factores. Por ejemplo la familia 101 obtuvo mejores porcentajes de mini-esquejes enraizados (30.6%), seguida de la familia 105 con el 26.2%; en la aparición de callo la familia 105 obtuvo mayor incidencia (30%) así como en la supervivencia el mayor porcentaje (56.2%).

Aunque no se encontró evidencia significativa la fertilización promueve el enraizamiento de los mini-esquejes, un 29.5%, en comparación con aquellos que no lo fueron (19%), además disminuyó la formación del callo y se obtuvo una mejor supervivencia. En cuanto a los que fueron sometidos a tratamientos de sombra se encontraron resultados opuestos ya que el mayor porcentaje de enraizamiento se obtuvo bajo condiciones de luz natural (25.4%), pero el tratamiento de sombra favoreció la formación de callo y la supervivencia (Cuadro 3). En mini-esquejes de *Cotinus coggygria* un tratamiento de sombra al 50% después de 6 semanas se obtuvo 74% de enraizado en relación al control con el 50%,

argumentan que la sombra incremento los niveles de carbohidratos en 50% con respecto al control (Pacholczak et al., 2005), con la fertilización y la sombra incrementamos los niveles de carbohidratos los cuales nos ayudan al enraizamiento de los mini-esquejes, porcentajes similares se encontraron en *Carpinus betulus* con el 73% de enraizado a los 25 días de introducirlos a la sombra, mientras que en el sombreado del 95% se obtuvieron porcentajes del 98% de enraizado (Maynard & Bassuk, 1992). Para esta investigación no obtuvimos porcentajes altos, se debe a la temperatura y humedad relativa que se presentó en porcentajes altos ($31.8\pm 2^{\circ}\text{C}$, 91%), lo que incrementó la incidencia de contaminación por hongos en la cámara de enraizamiento, podría deberse a factores de estrés en los mini-esquejes.

Cuadro 3. Porcentajes de supervivencia, mini-esquejes enraizados y con callo de cada factor en el enraizamiento de mini-esquejes de *P. leiophylla*.

Factor	Mini-esquejes (%) Enraizadas	Mini-esquejes (%) Callo	Supervivencia (%)
Familia			
51	16.2a	27.5a	43.7a
101	30.6a	23.7a	54.3a
105	26.2a	30.0a	56.2a
Fertilización			
0	19.1a	29.1a	48.3a
1	29.5a	25.0a	54.5a
Sombra			
0	25.4a	22.5a	47.9a
1	23.3a	31.6a	55.0a

Fertilización con 20-20-20 (NPK), 0= Sin fertilizante, 1=Con fertilizante; Sombra (50% de oscuridad), 0= A luz natural, 1= Tratamiento de sombra. Letras diferencias, indican que hay significancia.

2.3.2 Efecto de los tratamientos

No se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos, pero se obtuvieron mayores porcentajes de enraizamiento en las familias 101 y 105 con 42.5%, en los tratamientos de fertilización con y sin sombra respectivamente, lo que indica que a pesar de la contaminación que estuvo presente, el efecto de la fertilización ayudó a tener mayor porcentaje de enraizado (figura 6A). Hernández & Rabilar, (2012) mencionan que la fertilización de los setos tiene un efecto positivo en la inducción de raíces adventicias en los mini-esquejes de *P. radiata*. En cuanto a la formación de callo, no se encontraron diferencias significativas, la familia 105 presenta el mayor porcentaje de manera general en sus tratamientos con sombra sin importar la fertilización (Figura 6B), sugiriendo que el genotipo puede ser un factor que influye en los mini-esquejes. En mini-esquejes de *Bursera* sp. al mantener una alta humedad relativa se obtiene éxito en su enraizamiento (Bonfi-Sander, Mendoza-Hernández, & Ulloa-Nieto, 2007). Para el caso de *P. leiophylla*, la alta humedad relativa, contamina con hongo la cámara de enraizamiento y mato los mini-esquejes. En cuanto a la supervivencia, no se observó un efecto significativo de la fertilización y la condición de luz ya que los mayores porcentajes de esquejes vivos se obtuvieron tanto con fertilización y tratados bajo condiciones de sombra, como en aquellos sin fertilizante y con luz (Figura 6 C).

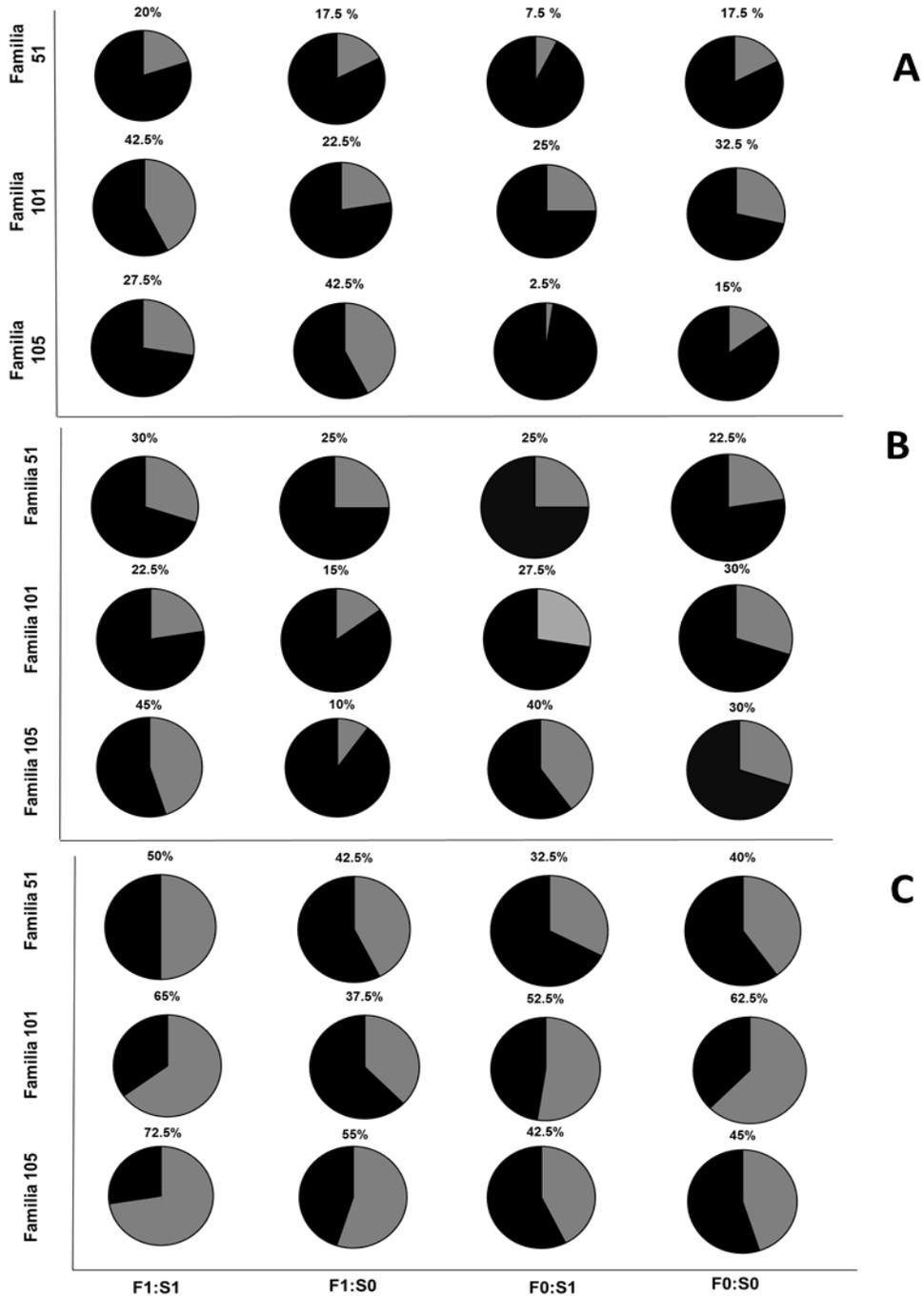


Figura 6. Porcentaje de enraizamiento (A) porcentaje formación de callo (B) y porcentaje de supervivencia (C) por tratamiento de los mini-esquejes de *P. leiophylla*. Color gris= enraizadas, callo, supervivencia, Color negro= No enraizadas, Sin callo, Muertas, F1= con fertilización, F0= sin fertilizante, S1: con sombra, S0= sin sombra.

2.3.3 Número y Longitud de las raíces

Los tratamientos evaluados (Familia, Fertilización y Sombra) no tuvieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en cada una de las variables de RP, RS y LR (Cuadro 4). Aun y cuando se logró entre un 16 y 30 % de enraizado en los mini esquejes en respuesta a la familia, condición de fertilización y sombra (cuadro 3), este porcentaje de respuesta pudo deberse a la dosis de AIB empleada, ya que las auxinas exógenas no tuvieron un reconocimiento por parte de las células o proteína receptora para originar algún cambio metabólico por lo que se requiere probar otras dosis para evaluar este factor. En *Berberidopsis corallina* la concentración interna de fitohormona fue suficiente para demostrar diferencias significativas al inducir raíces adventicias (Uribe et al., 2011).

Cuadro 4. Valores de significancia (P) del análisis de varianza de los efectos de tratamientos sobre las variables evaluadas en el experimento en plántulas de *P. leiophylla*.

Fuente de variación	GL	RP	RS	LR
Modelo	11	0.8763	0.6772	0.8894
Fam	2	0.2688	0.2107	0.7531
Fer	1	0.8290	0.7652	0.2127
Som	1	0.8734	0.3399	0.7932
Fam* Fer	2	0.9207	0.6849	0.5292
Fam*Som	2	0.8674	0.2226	0.5941
Fer*Som	1	0.3469	0.7816	0.6573
Fam*Fer*Som	2	0.2819	0.4447	0.6283

Fam= familia, Fer= fertilización, Som= Sombra, GL= grados de libertad, RP= Raíces primarias, RS= Raíces secundarias, LR= Longitud de raíz más larga.

2.3.4 Crecimiento de los mini-esquejes.

2.3.4.1 Altura

En cuanto a las alturas de las plántulas de *P. leiophylla*, no se encontraron diferencias significativas en los tratamientos fertilización y sombra, mientras que en el factor familia se encuentran diferencias en la altura de mes 2 y del mes 3 (Cuadro 5), debido a la capacidad de desarrollo de cada familia, su tasa de crecimiento, puede ser similar en edades tempranas, para después comenzar a crecer de manera distinta (Villar, López-Iglesias, Ruiz- Benito, De la Riva, & Zavala, 2014). Aunque no existe una interacción entre los factores evaluados en este experimento.

Cuadro 5. Valores medios y error estándar para cada altura de las plantas de *P. leiophylla*.

Factor	Mes 1 (Ene)	Mes 2 (Feb)	Mes 3 (Mar)	Mes 4 (Abr)
Familia				
51	1.27±0.13 a	2.65±0.24 a	2.45±0.15 a	3.10±0.34 a
101	1.23±0.10 a	1.73±0.13 b	1.91±0.13 b	3.02±0.22 a
105	1.22±0.09 a	1.87±0.19 b	2.10±0.20 ab	2.97±0.27 a
Fertilización				
0	1.35±0.11 a	1.98±0.14 a	2.10±0.14 a	2.85±0.22 a
1	1.16±0.07 a	1.99±0.14 a	2.09±0.13 a	3.13±0.21 a
Sombra				
0	1.16±0.08 a	2.12±0.16 a	2.06±0.13 a	2.87±0.21 a
1	1.32±0.09 a	1.83±0.13 a	2.13±0.14 a	3.18±0.22 a

0= sin fertilización o sombra, 1= con fertilización o sombra. Valores promedio ± error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

2.3.4.1 Diámetro

Para el diámetro solo se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el diámetro del mes 1 (Ene) (Zitácuaro & Aparicio, 2004) describen que la diferencias de alturas en las distintas procedencias se debe al factor genético y altitudinal. Para los siguientes meses no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (Cuadro 5), efecto similar ocurrió en el diámetro de *P. radiata* (Hernández y Rabilar, 2012).

2.4 CONCLUSIONES

A causa del alto porcentaje de Humedad Relativa, causó la muerte de gran cantidad de mini-esquejes de *P. leiophylla*, es recomendable mayor control en este factor así como en la temperatura. La fertilización en una dosis de 2g L^{-1} de fertilizante 20-20-20 N-P-K, promovió el 29.9% de formación de raíz después de 103 días sin haberse podido definir diferencias importantes con respecto a tratar los esquejes con sombra o por el origen materno de estos.

2.5 LITERATURA CITADA

- Alarcón, A., & Ferrera-Cerrato, R. (1999). Manejo de micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Revista Terra*. 17(3): 179–191.
- Aparicio, R. A., Juárez, S. C., & Sánchez., V. L. (2014). Propagación por enraizamiento de estacas y conservación de árboles plus extintos de *Pinus patula* procedentes del norte de Veracruz, México. *Revista Madera y Bosques*. Vol. 20, núm. 1:85-96.
- Bonfil, S. C., Mendoza, H. P., Ulloa, N. J. (2006). Enraizamiento y formación de callos en estacas de siete especies del genero *Bursera*. *Revista Agrociencia*. 41:103-109.
- Castelán, M. N., Jiménez, C. M., López, D. H., Campos, G. H., & Vargas, H. J. (2014). Familial variation in *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. seedlings in response to drought: water and osmotic potential. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 21(3): 295-306.
- Cuevas, J. J. C., Jiménez, C. M., Jasso, M. J., Pérez, P. R., López, U. J., & A. Villegas, M. (2014). Asexual propagation of *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. et Cham. *Revista Chapingo. Ciencias Forestales y del Ambiente* | Vol. XXI, núm. 1.
- Gómez, J. D., Ramírez, H. C., Jasso, M. J., López, U. J. (2010). Variación en características reproductivas y germinación de semilla de *Pinus leiophylla*. *Revista Fitotecnia, México*. 33(4):297-309.

- Hernández, A & Rubilar, R. (2012). Efecto de la fertilización nitrogenada y fosforada en el desarrollo y fenología de brotes de setos de *Pinus radiata*. *Revista Bosque*. 33(1): 53 –61.
- Laskowski, L.E. (2014). Contenido de carbohidratos en hojas y raíces de plantas de naranja 'Valencia' y mandarina 'Dancy' durante un ciclo anual de crecimiento. *Revista Facultad Agronomía (LUZ)*. 31: 1-22.
- Maynard, K. B. & Bassuk, L. N. (1992). Stock Plant Etiolation, Shading, and Banding Effects on Cutting Propagation of *Carpinus betulus*. *Jornal of the America Society For Horticultura Science*. 117(5) 740:744.
- Mesen, F. (1998). *Enraizamiento de estacas juveniles de especies forestales: uso de propagadores de sub-irrigación*. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza (CATIE). Costa Rica. 34pp.
- Miranda, T., Aloisio, X, & Campos, W, O. (2006). Clonal propagation if *Eucaliptus grandis* using the mini-cutting and micro-cutting techniques. *Scientia Forestalis*. n. 71, p. 109-117.
- Monsalve, J. R., Escobar, M., Acevedo, M., Sánchez, R. (2009). Efecto de la concentración de nitrógeno sobre atributos morfológicos, potencial de crecimiento radical y estatus nutricional en plantas de *Eucalyptus globulus* producidas a raíz cubierta. *Revista Bosque*. 30(2): 88-94.
- Pacholczak. A., Szydlo. W., Lukaszewska. A. (2005). The effect of etiolation and shading of stock plants on rhizogenesis in stem cuttings of *Cotinus coggygria*. *Physiologiae plantarum*. 27(4): 417-428.

- Sánchez, Z. J., Ortega, L. U., Majada, G. J., Txarterina, U. K. & Duñabeitia A. M. (2008). Optimización de la propagación vegetativa por estaquillado de genotipos de interés comercial en *Pinus radiata*. *Sociedad Española de Ciencias Forestales*. 28: 201-205.
- SAS (Statistical Analysis System) Institute. (2002). SAS/STAT Computer Software. Release 9.00. SAS Institute Inc. Cary.
- Uribe, E. M., Durán, R., Bravo, G., Mora, F., Cartes, P. & Delaveau, C. (2011). Propagación vegetativa de *Berberidopsis corallina* Hook.f., una especie en peligro de extinción, endémica de Chile. *Botánica Gayana*. 68(2) 135-140.
- Villar, R., López- Iglesias, B., Ruiz- Benito, P., De la Riva, E.G., Zavala, M. A. (2014). Crecimiento de plántulas y árboles de seis especies de *Quercus*. *Revista Científica de Ecología y Medio Ambiente*. 23(2): 64-72.
- Zitácuaro, C. F. & Aparicio, R. A. (2004). Variación de altura y diámetro de plántulas de *Pinus oaxacana* Mirov de tres poblaciones de México. *Foresta Veracruzana*. 6(1): 21-26
- Zobel, B., & Talbert, J. (1984). *Applied forest tree improvement*. New York, USA: John Wiley & Sons.

CAPITULO III. ENRAIZAMIENTO DE MINI-ESQUEJES DE *Pinus leiophylla* OBTENIDOS DE SETOS ETIOLADOS

RESUMEN

La propagación vegetativa es una técnica que ha avanzado considerablemente, por sus bajos costos, calidad en la obtención de los mini-esquejes; necesarios para el mejoramiento y producción de planta utilizada principalmente para huertos clonales y plantaciones comerciales. La etiolación es un método que se basa principalmente pre-acondicionar la planta madre o seto en ausencia de la luz, modificando el tejido anatómico de la planta y desarrollando un esclerénquima más débil, ayudando así al enraizamiento de los mini-esquejes. En el género *Pinus* es importante conocer el grado de juvenilidad de la planta madre, la aplicación de auxinas sintéticas, tipo de sustrato y condiciones ambientales que determinen el enraizamiento de mini-estacas. *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. tiene una amplia distribución natural en México, es de rápido crecimiento, altamente recomendada para restauración y reforestación de sitios degradados. El trabajo evaluó los porcentajes de enraizamiento, número de raíces y el crecimiento de las plantas procedentes mini-esquejes etiolados de la progenie de tres árboles selectos de un huerto semillero sexual de *P. leiophylla*. El experimento se estableció bajo con arreglo factorial 3x4x2: tres familias (51, 101, 105), cuatro periodos de etiolación (testigo, 7 días, 14 días, 21 días) y dos concentraciones de AIB (testigo y 5000 ppm), generando 24 tratamientos. Cada tratamiento con 12 réplicas. Los resultados mostraron que la etiolación a 21 días incremento los porcentajes de enraizamiento (81%)

en comparación con el testigo, con el (74%). La dosis de 5000 ppm de AIB, fue mayor en un 83% con respecto al testigo con el 57%; mientras que la familia que tuvo una mejor respuesta con respecto a los tratamientos fue la 105 con el 78% seguida de la familia 51 con el 67% y la familia 101 con el 65%. Para la inducción de raíces se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.005$) en los tratamientos. Por ello es recomendable la utilización de la técnica de etiolación para el enraizamiento de mini-esquejes de *P. leiophylla*.

Palabras clave: clonación, etiolación, mini-esquejes, *Pinus leiophylla*, propagación vegetativa.

ABSTRACT

Vegetative propagation is a technique that has advanced considerably, due to its low cost, quality in obtaining the mini-cuttings; needed to improve production and plant used mainly for commercial orchards and clonal plantations. Etiolation is a method based mostly pre-condition the mother plant or hedge in the absence of light, by modifying the anatomical tissue of the plant and developing a weaker sclerenchyma, thus helping the rooting of mini-cuttings. In the genus *Pinus* is important to know the degree of juvenility of the mother plant, the application of synthetic auxin, type of substrate and environmental conditions that determine the rooting of mini-cuttings. *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. it has a wide natural distribution in Mexico, is fast-growing, highly recommended for restoration and reforestation of degraded sites. The study evaluated the percentage of rooting, number of roots and growth of plants from cuttings mini-etiolated progeny of three select trees of a sexual *P. leiophylla* seed orchard. The experiment was established under factorial 3x4x2 with: three families (51, 101, 105), four periods of etiolation (witness, 7 days, 14 days, 21 days) and two concentrations of AIB (control and 5000 ppm), generating 24 treatments. Each treatment with 12 replicates. The results showed that etiolation to 21 days increase rooting percentages (81%) compared with the control, with (74%). The dose of 5000 ppm of AIB, was higher by 83% compared with the control to 57%; while the family had a better response with respect to treatment was 105 with 78% followed by 51 families with 67% and 101 family with 65%. For root induction significant differences ($P \leq 0.005$) in the treatments. It is therefore advisable to use the technique etiolation for rooting of mini-cuttings of *P. leiophylla*.

Key words: cloning, etiolation, mini-cuttings, *Pinus leiophylla*, vegetative propagation.

3.1 INTRODUCCIÓN

La silvicultura clonal basada en la clonación y propagación masiva de genotipos genéticamente superiores ha avanzado considerablemente con la técnica de rejuvenecimiento vegetativo para la obtención de mini-esquejes. Debido a su bajo costo y calidad del producto, las empresas forestales han incorporado la técnica en sus esquemas de mejoramiento y producción de planta demandada por las plantaciones comerciales y huertos clonales.

Los mini-esquejes rejuvenecidos, fragmentos apicales de rama sin lignificar de 3 a 6 cm de longitud, se obtienen a través de los brotes inducidos por el manejo y podas de las plantas madre. En algunas especies, como las del género *Populus*, los mini-esquejes son relativamente fáciles de enraizar; sin embargo, para las del género *Pinus* el proceso no es sencillo y ha requerido de mayor estudio. Investigaciones con diferentes especies de pinos señalan que el manejo de la juvenilidad, la aplicación de auxinas sintéticas, tipo de sustrato y condiciones ambientales determinan el enraizamiento de mini-estacas. *Pinus leiophylla* Schiede ex Schtdl. & Cham. de amplia distribución natural en México, productora de resina y recomendada para restauración y reforestación de sitios degradados; podría ser un modelo de propagación vegetativa por mini-esquejes, debido a su capacidad para producir brotes, que representan mini-esquejes potenciales. Esta característica, poco común en pinos, es considerada una respuesta adaptativa en respuesta a daño foliar generado por factores bióticos y abióticos. Sin embargo, el tema del enraizamiento aún no se ha resuelto, particularmente para clonar arboles maduros. Una alternativa es usar plantas juveniles, procedentes de semilla, con mayor capacidad

de generar esquejes juveniles. En investigaciones previas, el máximo enraizamiento alcanzado en mini-estacas de plantas de *P. leiophylla*, probando tipos de sustratos y concentraciones de auxinas, fue de 45% (Cuevas, Jiménez, Jasso, Pérez, López, & Villegas, 2014). Por lo que es necesario implementar otros métodos para incrementar tales porcentajes de enraizamiento.

Desde hace tiempo la etiolación inducida ha sido relevante para promover el enraizamiento en estacas de especies difíciles de enraizar. La exclusión de luz para pre-acondicionar el tejido a enraizar tiene que ver con dos aspectos: 1) promover la juvenilidad del tejido y 2) alterar la concentración de auxinas endógenas. Con el pre-acondicionamiento se ha visto que se adelgaza la pared celular, decrece la lignificación del floema y fibras pericíclicas, se genera gran proporción de células parenquimatosas y los niveles endógenos de auxinas se modifican. La etiolación de tejidos ha incrementado el porcentaje de enraizamiento y mejorado la calidad de raíz en estacas de varias especies, donde se atribuye el efecto a cambios anatómicos y al desbalance hormonal de los tejidos (Husen, 2011; Pacholczak, Szydło, & Lukaszewska, 2005). Este procedimiento podría ayudar a incrementar la producción y calidad de raíces adventicias en mini-esquejes procedentes de plantas jóvenes de *P. leiophylla*.

Por lo tanto, bajo la hipótesis de que la etiolación pre-acondiciona el tejido para potenciar la acción de la auxinas y lograr la inducción de raíces adventicias, en este trabajo se tiene el objetivo de analizar el efecto de la etiolación y el ácido indolbutírico (AIB) en el enraizamiento de mini-esquejes, procedentes de plantas procedentes de tres familias selectas establecidas en un huerto semillero sexual de *P. leiophylla*.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Sitio experimental

El experimento se llevó a cabo en el invernadero y vivero forestal del huerto semillero sexual de *Pinus leiophylla*, localizado en las instalaciones del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, ubicado en el municipio de Texcoco, Estado de México con coordenadas geográficas 19° 27' 34.8" LN y 98° 54' 15.8" LO, a una altitud aproximada de 2250 m.

3.2.2 Material vegetal

En la primavera del 2014, semilla procedente de tres familias (51, 101, 105) del huerto semillero sexual de *P. leiophylla*, seleccionadas por su rápido crecimiento, fuste recto y tolerancia a factores bióticos y abióticos, fueron germinadas. Las plántulas producidas crecieron en tubetes de 310 ml, llenados con sustrato de turba-agrolita-tierra de monte con relación a 3:1:1. Cuando las plantas tuvieron 12 meses de edad se trasplantaron a tubetes de 1L con una mezcla de turba, agrolita, vermiculita, suelo de monte (7:1:1:1) como sustrato y fertilizante de lenta liberación (osmocote® 7g L⁻¹) adicionado.

3.2.3 Tratamientos y diseño experimental

3.2.3.1 Etiolación

En primavera del 2016, plantas con brotes de aproximadamente 5 cm fueron sometidas a tratamientos de exclusión de luz por intervalos de tiempo (0, 7, 14 y 21 días), para inducir diferentes grados de etiolación. Se utilizaron 2 plantas por familia, teniendo un total de 6 plantas por periodo; Las plantas testigo (tiempo 0) estuvieron en condiciones de luz natural durante el día, registrando una intensidad luminosa (I_v) promedio de 1059 lux; mientras que las tratadas sin luz se establecieron en una cámara, de 1 m de ancho x 1.5 m de largo x 1m de alto, cubierta con tela negra que mantenía una I_v de 11.8 lux. Durante el tratamiento, las plantas fueron regadas y fertilizadas dos veces por semana, con una solución de 1 g L⁻¹ de fertilizante comercial peters® (20-20-20) con pH de 5.5.

3.2.4 Obtención de mini-esquejes y aplicación de AIB

Al final de cada periodo, un grupo de dos plantas por familia fue sustraído aleatoriamente de la cámara. Enseguida, brotes de cada planta fueron podados de la planta donante, para obtener mini-esquejes de 6 cm de longitud; a los cuales se les removió una tercera parte de las acículas para evitar transpiración excesiva, e inmediatamente se colocaron en una solución de captan 2 g L⁻¹, donde permanecieron por 5 min. Entonces, los mini-esquejes se trataron con ácido indolbutírico (AIB) (0 y 5000 ppm) y se establecieron en cámaras de enraizado (70 cm de largo x 60 cm de ancho x 15 cm de alto) llenadas con agrolita, previamente humedecida con una solución de captan 2 g L⁻¹. Durante el

experimento la temperatura registrada en las cámaras estuvo entre 11.7°C y 31.9°C y la humedad relativa entre 90.6% y 98.3%.

El experimento tuvo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x4x2: tres familias, cuatro periodos de etiolación y dos concentraciones de AIB, generando 24 tratamientos (cuadro 7). Cada tratamiento con 12 réplicas (288 mini-esquejes en total).

Cuadro 6. Periodos de tratamientos de etiolación realizados a plantas procedentes de tres familias de *P. leiophylla* de 24 meses de edad; y tratamientos posteriores de AIB a los mini-esquejes generados de las plantas previamente etioladas.

Tratamiento	Familia	Etiolación (días)				Auxina (ppm)	
		0	7	14	21	0	5000
T1	51	+	-	-	-	-	+
T2	51	-	+	-	-	-	+
T3	51	-	-	+	-	-	+
T4	51	-	-	-	+	-	+
T5	101	+	-	-	-	-	+
T6	101	-	+	-	-	-	+
T7	101	-	-	+	-	-	+
T8	101	-	-	-	+	-	+
T9	105	+	-	-	-	-	+
T10	105	-	+	-	-	-	+
T11	105	-	-	+	-	-	+
T12	105	-	-	-	+	-	+
T13	51	+	-	-	-	+	-
T14	51	-	+	-	-	+	-
T15	51	-	-	+	-	+	-
T16	51	-	-	-	+	+	-
T17	101	+	-	-	-	+	-
T18	101	-	+	-	-	+	-
T19	101	-	-	+	-	+	-
T20	101	-	-	-	+	+	-
T21	105	+	-	-	-	+	-
T22	105	-	+	-	-	+	-
T23	105	-	-	+	-	+	-
T24	105	-	-	-	+	+	-

3.2.5 Trasplante de mini-esquejes enraizados

Una vez enraizados y evaluados, los mini-esquejes fueron trasplantados a tubetes de plástico de 1L, llenados con una mezcla de turba, agrolita, vermiculita y suelo de monte con relación (7:1:1:1); con fertilizante de lenta liberación (osmocote® 7g L⁻¹) adicionado (Figura 1). Las plantas fueron mantenidas mediante riegos dos veces por semana y fertilizadas una vez cada 15 días con una solución de 1g L⁻¹ de fertilizante comercial peters® (N-P-K, 30-20-10) (Figura 7).

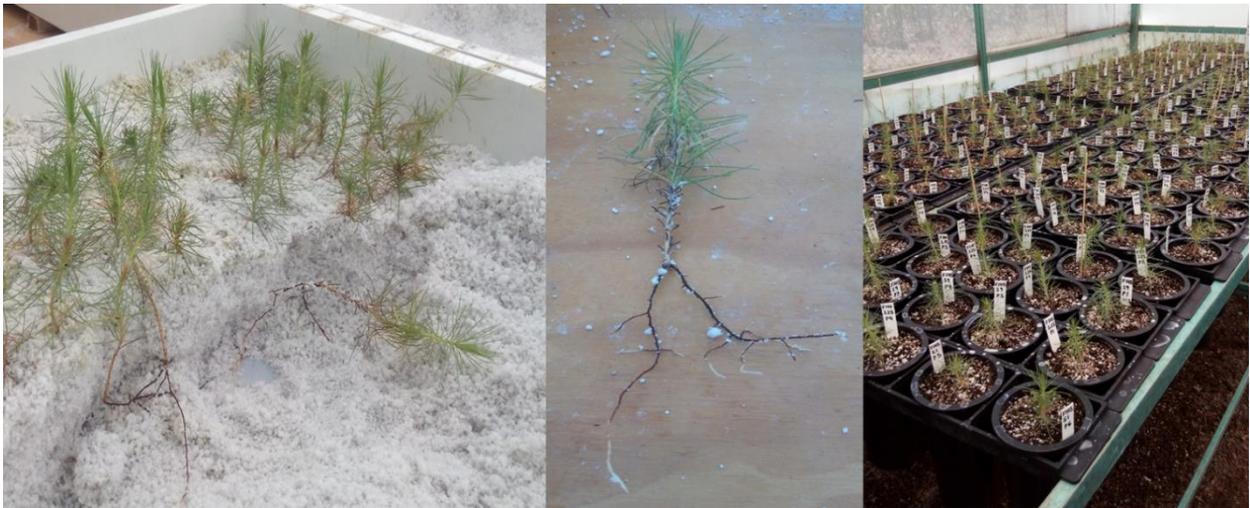


Figura 7. Extracción de la cámara de enraizamiento y trasplante de los mini-esquejes de *P. leiophylla*.

3.2.6 Variables a evaluar

A los 98 días de establecido el experimento, los mini-esquejes fueron extraídos, considerando vivos los que tienen raíz y callo, y muertas los que estaban secos, a los

mini-esquejes vivos, se evaluaron sus características morfológicas de los mini-esquejes, como son la altura (A) y su diámetro a la base del tallo (DBT), se consideró un mini-esqueje enraizado cuando presentaba al menos una raíz principal de ≥ 0.5 cm de longitud. En los mini-esquejes enraizados se registró el número de raíces de primer (RP) y segundo orden (RS), así como la longitud de la raíz más larga (LR).

3.2.7 Evaluación del desarrollo de los mini-esquejes etiolados

Después de tres meses del trasplante de los mini-esquejes etiolados y enraizados se evaluó el crecimiento (A y DBT) mediante una regla graduada (± 1 mm) y un vernier digital (± 0.01 mm).

3.2.8 Análisis de datos

Previo a los análisis, porcentajes de enraizamiento, callo y supervivencia fueron normalizados con la función arcoseno y usados para el análisis de varianza de acuerdo al modelo línea (3) y realizado con el procedimiento GLM en el programa SAS (SAS Institute, 2002). La diferencia entre medias se llevó a cabo mediante la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$). En cuanto al crecimiento de las plantas provenientes de mini-esquejes se comprobó la normalidad de los datos y se realizó el análisis de varianza de acuerdo al modelo (3) mediante el procedimiento GLM del programa SAS (SAS Institute, 2002). La comparación de medias se llevó a cabo mediante la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$)

3.2.9 Modelo estadístico

$$y_{ijk} = \mu + FA_i + ET_j + DO_k + FAET_{ij} + FADO_{ik} + ETDO_{jk} + FAETDO_{ijk} + \varepsilon_{ijkl} \quad (3)$$

Donde: y_{ijk} = Valor de la variable observada de la i – esima familia, con la j – esima días de etiología en la k - esima dosis de AIB. μ = media general. FA_i = efecto de la i – esima familia (51-101-105). ET_j = efecto de la j – esima días de etiología (0, 7, 14, 21 días). DO_k = efecto de la k - esima dosis de AIB (0-5000). $FAET_{ij}$ = efecto de la interacción de la i – esima familia con la j – esima etiología. $FADO_{ik}$ = efecto de la interacción de la i – esima familia con la k - esima dosis de AIB. $ETDO_{jk}$ = efecto de la interacción j – esima etiología con la k - esima dosis de AIB. $ETDO_{jk}$ = efecto de la interacción j – esima etiología con la k - esima dosis de AIB. $ETDO_{jk}$ = efecto de la interacción j – esima etiología con la k - esima dosis de AIB. $FAETDO_{ijk}$ = efecto de la interacción de la i – esima familia con la j – esima etiología, la k – esima dosis de AIB. ε_{ijk} = Efecto del error.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Etiolación

Los tratamientos de exclusión causaron etiolación de manera gradual en las plantas, efecto esperado. A mayor tiempo de exclusión de luz, mayor desvanecimiento del color verde fue observado en las plantas, con un cambio del tono verde intenso (plantas control) a verde desvanecido (plantas en exclusión de luz por 20 días) (Figura 8). Este efecto se debió a la degradación de clorofilas en las hojas de las plantas expuestas a los periodos de oscuridad, como se señala en otros trabajos similares (Pacholczak et al., 2005). Aunque las plantas sometidas a 20 días de oscuridad alcanzaron el mayor desvanecimiento de color verde (Figura 8), esto no causo mortalidad ni daño (necrosis) en los rebrotes y en la planta en general.



Figura 8. Efecto de la exclusión de luz, en diferentes periodos (días), en el color de las acículas observadas en plantas de *P. leiophylla* sometidas a los tratamientos respectivos.

3.3.2 Enraizamiento de mini-esquejes

3.3.2.1 Efecto de las fuentes de variación

Los tratamientos y algunas de sus interacciones mostraron significancia para el enraizamiento (ER) y formación de callo (CAL), pero no tuvieron efecto en la supervivencia (SUP) de mini-esquejes (Cuadro 8).

Cuadro 7. Valores de significancia P del análisis de varianza para enraizamiento (ER), formación de callo (CAL) y supervivencia (SUP) de mini-esquejes de *P. leiophylla*.

Fuente de Variación	GL	ER	CAL	SUP
FA	2	0.0135*	0.0264*	0.6528
ET	3	0.0001*	0.0083*	0.0782
AU	1	0.0009*	0.0052*	0.1995
FA*ET	6	0.5194	0.0332*	0.5938
FM*AU	2	0.3748	0.3448	0.9514
ET*AU	3	0.0445*	0.0140*	0.9602
FA*ET*AU	6	0.7964	0.1595	0.9426

* Con diferencias significativas ($P \leq 0.05$). FA: Familia, ET: Etiolación, AU: concentración de Auxina, GL: Grados de Libertad, ER: Enraizamiento, CAL: Formación de callo, SUP: Supervivencia

3.3.2.2 Supervivencia

La supervivencia de mini-esquejes no fue afectada por los tratamientos (Cuadro 8), aunque se mantuvo por arriba del 80 % en todos los tratamientos que incluyeron los factores probados, tanto en las mini-estacas enraizadas como en las no enraizadas (pero con callo); únicamente los que estuvieron en tratamientos testigo mostraron menores porcentajes de supervivencia (Figura 9). Esto demuestra que tanto la etiolación inducida

como la concentración probada de AIB no dañaron los tejidos ni generaron toxicidad en mini-esquejes. Además, la formación de raíces adventicias, fue mayor al aplicarse AIB y se evitó la muerte de mini-esquejes; al restaurar la conexión entre sistemas de conducción.

3.3.2.3 Efecto familia

Entre familias el porcentaje de mini-estacas enraizadas estuvo entre 65 y 78%, donde las mini-estacas de plantas procedentes de la familia 105 superaron en 13% el enraizamiento mostrado por el de las mini-estacas de las familias 51 y 101 (Cuadro 3). Esta variación en enraizamiento debido al genotipo también se ha reportado en algunas especies de las *Podocarpáceas*, diferencias que se atribuyen principalmente a las características genéticas y fenotípicas del material vegetal (Castillo, Cueva, Aguirre, & Günter, 2007); por lo que el origen y calidad genética se debe considerar en trabajos de propagación vegetativa a través de estacas (Doll, Rodríguez, Soto, & Razmilic, 2012).

3.3.2.4 Efecto AIB

Mini-esquejes tratados con AIB incrementaron el porcentaje de enraizamiento en más de 20%, respecto a los no tratados (Cuadro 3). Efecto importante del AIB para mejorar el enraizamiento de estacas de especies arbóreas, particularmente coníferas (Cuevas et al., 2014); aunque se debe considerar la dosis óptima para cada especie, ya que dosis elevadas de AIB, pueden inhibir el proceso de rizogénesis (Ruiz, Vargas, Cetina, & Villegas, 2005; Latsague, Saez, & Yáñez, 2009; Vallejos–Torres, Gonzales–Polar, & Arévalo–López, 2014). Aunque en este estudio el porcentaje de enraizamiento obtenido

con la dosis probada fue sobresaliente, se considera necesario estudiar el efecto de la dosis AIB alrededor de la evaluada en el presente estudio para eficientizar y buscar obtener el 100% de enraizamiento independientemente del genotipo.

3.3.2.5 Efecto etiolación

La exclusión de luz afecto positivamente el enraizamiento de mini-esquejes; observándose un incremento en el enraizado conforme al tiempo de etiolación. Particularmente con el tratamiento prolongado (21 días) de oscuridad, para inducir etiolación en las plantas, se incrementó el enraizamiento en 30%, respecto a las plantas testigo (0 días) (Cuadro 9). El efecto de la etiolación en la inducción de raíces adventicias en estacas es conocido desde hace varias décadas (Pacholczak, Szydlo, & Lukaszewskase, 2005). Varios estudios en especies arbóreas han señalado que la etiolación facilita la inducción de raíces adventicias en mini-esquejes, ya que en los tejidos se presentan alteraciones estructurales en vías de transporte de nutrientes y hormonas, se incrementan los niveles endógenos de auxinas (Rapaka, Bessler, Schreiner & Druege, 2005; Tao et al., 2008) y el proceso de lignificación se retarda con lo que se favorece el rejuvenecimiento de los brotes (Husen, 2008; De Souza et al., 2014).

Cuadro 8. Porcentajes de enraizamiento, callo y supervivencia en cada factor probado en el experimento de enraizamiento de mini-esquejes de *P. leiophylla*.

Tratamientos	Enraizadas (%)	Callo (%)	Supervivencia (%)
Familia			
51	67.7 b	13.5 ab	81.2 a
101	65.6 b	19.7 a	85.3 a
105	78.1 a	8.3 b	86.4 a
Dosis de AIB (ppm)			
0	57.6 b	18.7 a	76.3 a
5000	83.3 a	8.3 b	91.6 a
Etiolación (Días)			
0	51.9 b	22.2 a	74.1 a
7	70.8 ab	11.1 ab	81.9 a
14	79.1 ab	12.5 ab	91.6 a
21	81.9 a	8.3 b	90.2 a

ÁIB: Acido indolbutírico, ppm: partes por millón. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

3.3.3 Interacciones

3.3.3.1 Supervivencia

Los tratamientos no afectaron la supervivencia de los mini-esquejes, estadísticamente no hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$); entre las familias con los tratamientos (Cuadro 9). Aunque la familia 105 mostro los mejores resultados, teniendo hasta porcentajes arriba del 90% y en dos tratamientos porcentajes arriba del 50%, mientras que la familia 51, obtuvo porcentajes de supervivencia arriba del 60% en cada uno de sus tratamientos, de manera similar se mostró la familia 101 (Figura 9) en mini-esquejes de *Malpighia emarginata*, se registraron porcentajes de supervivencia mayores al 90% en tratamientos con 5000 de AIB (Rivero, Ramírez, Caraballo & Guerrero, 2005).

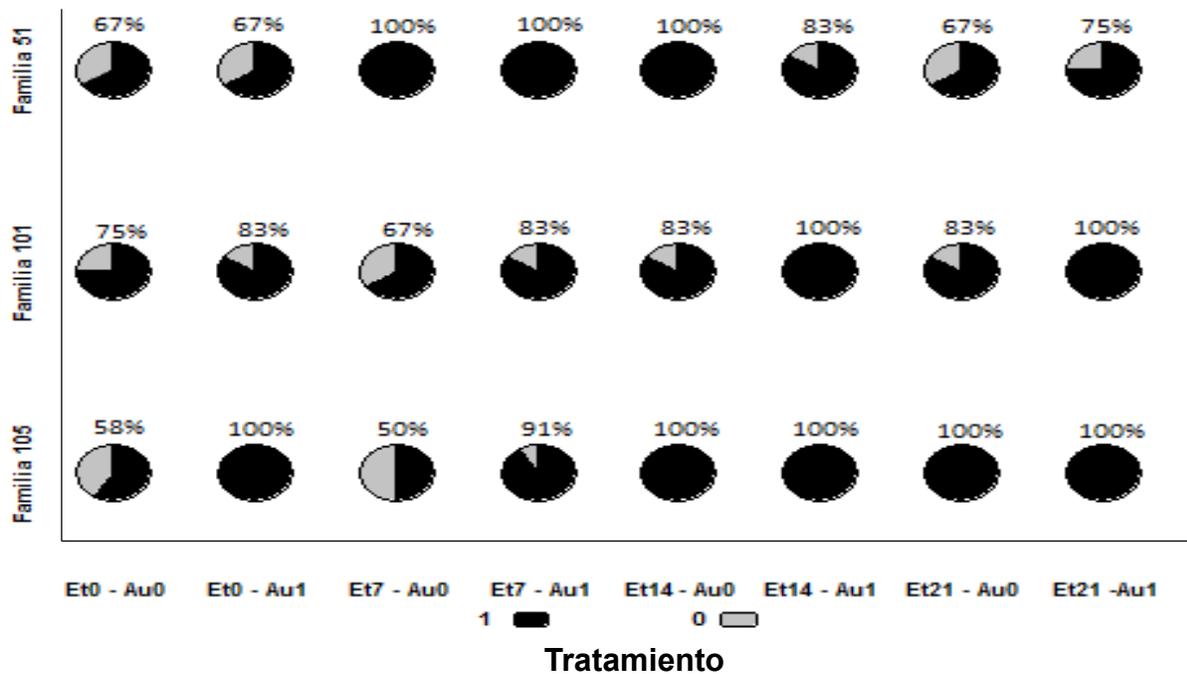


Figura 9. Porcentaje de supervivencia en los tratamientos de etiolación. 1: Supervivencia 0: Muertas. Et0: (0 días a oscuridad), Et7 (7 días a oscuridad), Et14 (14 días a oscuridad), Et21 (21 días a oscuridad), Au0: sin AIB, Au1:5000ppm AIB.

3.3.3.2. Enraizamiento

Mini-esquejes etiolados con AIB de la familia 105 tuvieron los más altos porcentajes de enraizamiento, en casi todas sus combinaciones de los tres factores estuvieron arriba del 90% y en dos de ellas se alcanzó el 100%; mientras que en los correspondientes a la familia 51 los porcentajes estuvieron por debajo del 80%, aunque en una combinación se alcanzó el 100% (Figura 10). Esta variación en la capacidad de enraizamiento observada entre familias, en mayor o menor grado, y en combinación con los factores probados también se ha reportado en estudios similares con *Pinus pinaster*, donde se concluye que la inducción de raíces adventicias está en función de la plasticidad

genotípica (familia) y controlada genéticamente (Martínez-Alonso et al., 2012). Sin embargo, como es señalado, poco se ha hecho para confirmarlo y realizar trabajos que nos permitan saber el grado de heredabilidad en la capacidad de enraizamiento del genotipo, por lo que más estudios son necesarios para asegurar que a través del sistema de mini-esquejes (bajo manejo con etiolación y AIB) se puede llevar a cabo selección de genotipos superiores para su propagación clonal masiva e intensiva.

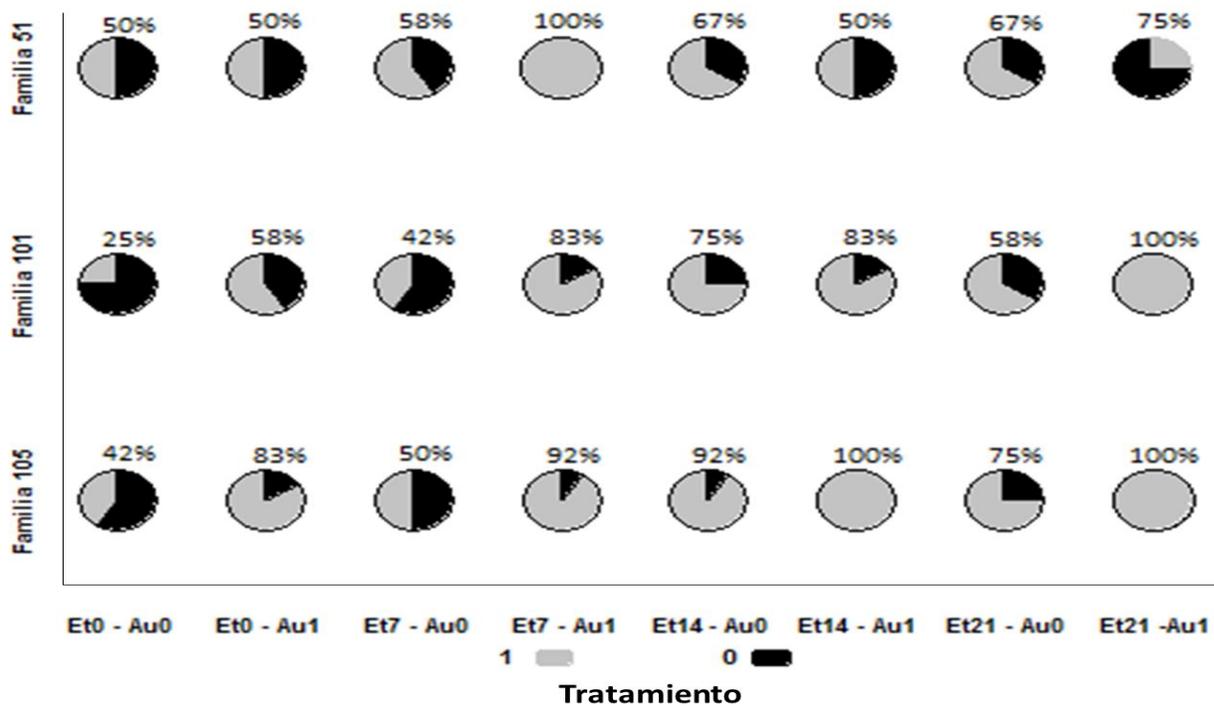


Figura 10. Porcentaje de enraizamiento en los tratamientos de etiolación. 1: mini-esquejes enraizados; 0: no enraizados. Et0: (0 días a oscuridad), Et7 (7 días a oscuridad), Et14 (14 días a oscuridad), Et21 (21 días a oscuridad), Au0: sin AIB, Au1:5000ppm AIB.

3.3.3.3 Formación de callo

Aunque en porcentajes menores, pero el desarrollo de callo se generó en los mini-esquejes; en mayor porcentaje en los correspondientes a la familia 101 y 51 que no fueron sometidos a tratamientos de AIB y etiolación (Cuadro 9 y Figura 11). De la misma manera, en *Tectona grandis* esquejes no etiolados tuvieron mayor formación de callo (Husen, 2011). De acuerdo con algunos autores el desarrollo de raíces adventicias en mini-esquejes depende de la formación de células meristemáticas, generadas por procesos de inducción establecidos por factores externos e internos (Brondani et al., 2012). En nuestro estudio, la etiolación y AIB pudieron ser responsables de definir esos factores externos que iniciaron la diferenciación de esas células meristemáticas que dieron lugar a la formación de raíces y estructuras que permitieron reestablecer la conexión con los tejidos conductivos. Por otro lado, se sabe que células que no diferenciaron a raíces formaron callo, estructura celular no deseable por la pérdida de conexión con tejido conductor, fragilidad y sin definición a estructura radicular (LI et al., 2009). Poco se ha hecho para evitar la formación de callo por lo que se recomienda efectuar mayor trabajo de investigación en ese aspecto, que podría llevar a la muerte del mini-esqueje. En nuestro trabajo la etiolación y AIB evitaron en gran medida la formación de callo en mini-esquejes de *P. leiophylla*.

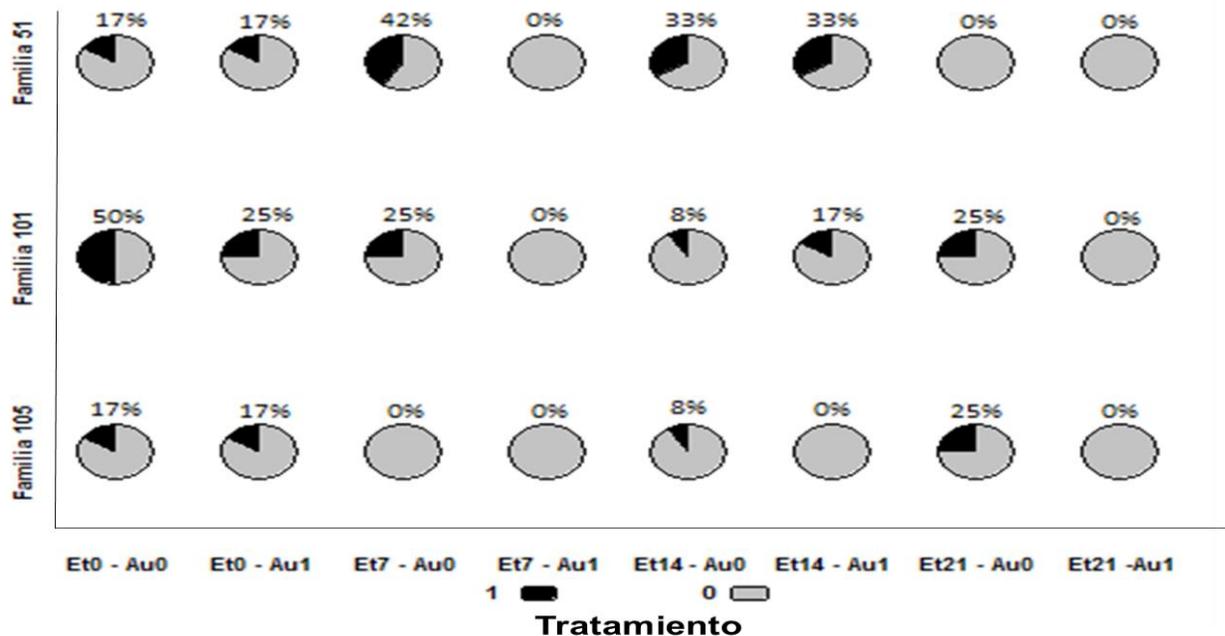


Figura 11. Porcentaje de inducción de callo en los tratamientos de etiolación. 1: Formación de callo 0: sin callo. Et0: (0 días a oscuridad), Et7 (7 días a oscuridad), Et14 (14 días a oscuridad, Et21 (21 días a oscuridad), Au0: sin AIB, Au1:5000ppm AIB.

3.3.4 Crecimiento y Morfología de raíces

Los factores probados (familia, etiolación y AIB) afectaron significativamente ($P \leq 0.05$) el desarrollo de raíces primarias (RP), secundarias (RS) y la longitud de raíz (LR) de los mini-esquejes enraizados (Cuadro 9).

Cuadro 9. Valores de significancia *P* del análisis de varianza de los efectos de tratamientos sobre altura y diámetro a base de tallo y morfología de raíz en mini-esquejes enraizados de *P. leiophylla*.

Fuente de variación	GL	A	DBT	RP	RS	LR
FA	2	0.0700	0.7030	0.1776	0.0001*	0.0243*
ET	3	0.0008*	0.0002*	0.0036*	0.0002*	0.0082*
AU	1	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.5327	0.1476
FA*ET	6	0.0125*	0.4292	0.3119	0.0134*	0.2262
FA*AU	2	0.0747	0.6509	0.4897	0.0475*	0.5403
ET*AU	3	0.6622	0.1519	0.0003*	0.2949	0.1676
FA*AU*ET	6	0.9700	0.2226	0.4888	0.3204	0.3441

* Con diferencias significativas ($P \leq 0.05$). FA: Familia, ET: Etiolación, AU: concentración de Auxina, GL: Grados de Libertad, A: Altura de los mini-esquejes enraizados, DBT: Diámetro a la base del tallo de los mini-esquejes, RP: Raíces primarias, RS: Raíces secundarias, LR: Longitud de la raíz más larga.

La morfología de raíz de los mini-esquejes correspondientes a la familia 105 supero en RP, RS y LR a los de las otras familias en aproximadamente 10, 60 y 30%, respectivamente. Con AIB la morfología poco vario; mientras que la etiolación mejoro ligeramente la morfología en los parámetros señalados (Cuadro 10). Resultados similares se reportaron en estacas de *Tectona grandis*, respecto al incremento en longitud y ramificación de raíces cuando las plantas donadoras fueron etioladas (Husen, 2008; Husen, 2011). La longitud y fibrosidad (raíces primarias y secundarias) de la raíz son caracteres importantes para el desarrollo y crecimiento de la planta ya que incrementa el área absorción de nutrientes y agua (Davis & Jacobs, 2005). Para los mini-esquejes es vital establecer y acelerar los procesos involucrados en las relaciones

hídricas de las plantas, particularmente después de que el esqueje se mantuvo por un periodo considerable sin conexión directa con el sustrato. Por tanto, mini-esquejes que desarrollen estos caracteres, en cantidad y calidad, tendrán más oportunidad de sobrevivir y generar plantas más vigorosas.

Cuadro 10. Valores medios y error estándar para cada factor en la morfología de raíz de mini-esquejes de *P. leiophylla*.

Factor	Número de raíces		Longitud raíz más larga (cm)
	Primarias	Secundarias	
Familia			
51	1.54 ± 0.15 a	0.86 ± 0.15 b	5.92± 0.51 b
101	1.37 ± 0.13 a	1.91± 0.25 a	5.97± 0.51 ab
105	1.70 ± 0.14 a	2.20 ± 0.26 a	8.48 ± 1.11 a
Dosis de AIB (ppm)			
0	0.98 ± 0.09 a	1.74 ± 0.21 a	6.16 ± 0.83 a
5000	2.09 ± 0.12 b	1.58± 0.17 a	7.42 ± 0.34 a
Etiolación (Días)			
0	1.15 ± 0.16 b	1.06 ± 0.26 b	4.52 ± 0.60 b
7	1.90 ± 0.20 a	1.16 ± 0.21 ab	6.35± 0.59 ab
14	1.47 ± 0.14 ab	1.95 ± 0.28 b	8.35 ± 1.42 a
21	1.63 ± 0.13 ab	2.45 ± 0.30 a	7.94± 0.63 a

Valores promedio ± error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

3.3.5 Morfología de mini-esquejes enraizados

Entre familias el crecimiento de los brotes fue similar, pero los tratamientos de etiolación y auxina si los afectó significativamente ($P \leq 0.05$) en su A y DBT; además, para estas mismas variables hubo interacción en FA*ET (Cuadro 11). Las familias que resultaron con mejor respuesta al introducirlas a oscuridad a los 21 días fueron la familia 101 y 105 con el 100% de sus mini-esquejes enraizados.

El crecimiento en altura y diámetro se encontraron diferencias significativas en la aplicación de AIB, mientras que en la altura también se encontraron diferencias en los tratamientos en tiempos de inducción a oscuridad, incrementando su tamaño a los 14 y 21 días; mientras que en el diámetro para esta variable no se encontraron diferencias para la etiolación así como para las familias (Figura 12). Aun no se han registrado trabajos en donde se evalué el efecto de la etiolación en el crecimiento de los mini-esquejes.

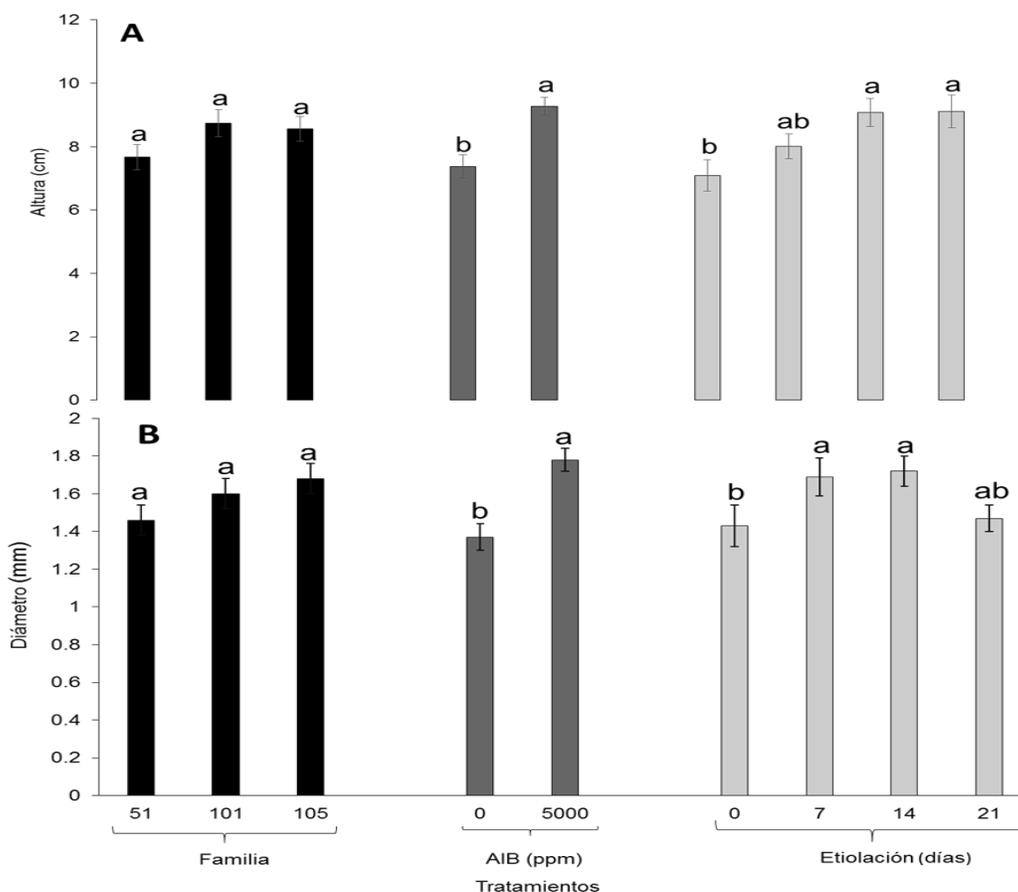


Figura 12. Características morfológicas de los mini-esquejes de *P. leiophylla*. Valores promedio \pm error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) A: altura de los mini-esquejes de *P. leiophylla*. B: Diámetro de los esquejes de *P. leiophylla*. 0= sin ácido indolbutírico, sin etiolación (testigo).

3.3.6 Crecimiento y morfología de clones

Después de tres meses del trasplante todas las plantas mostraron crecimiento recto o dominancia apical, sin bifurcación de tallo ni inclinación. Por otro lado, a diferencia de las plantas producidas por semilla, las plantas de mini-esquejes enraizados no muestran desarrollo de ramas basales; carácter que en este estudio diferencia a las plantas de *Pinus leiophylla* propagadas vegetativamente. En cuanto a la aparición de hojas secundarias ya se hace evidente en todas las plantas (Figura 13).

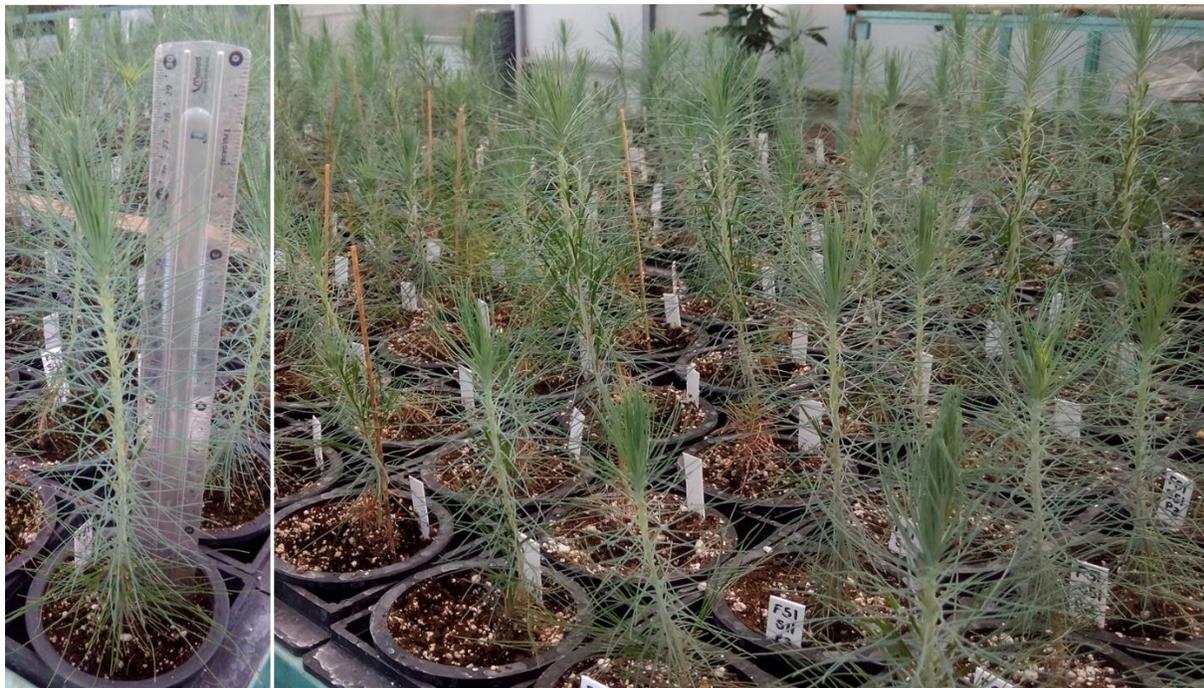


Figura 13. Plantas de *P. leiophylla* producidas de los mini-esquejes después de tres meses de trasplante.

En el análisis de varianza para altura (A) se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$), en FA, ET y en las interacciones de FA*ET, ET*AU y FA*AU*ET; mientras que

en DBT se encontraron diferencias en FA y AU, sin efecto en las interacciones (Cuadro 11).

Cuadro 11. Plantas de *P. leiophylla* producidas de los mini-esquejes después de tres meses de trasplante.

Fuente de variación	GL	A	DBT
FA	2	0.0058*	0.0121*
ET	3	0.0032*	0.1428
AU	1	0.9574	0.0001*
FA*ET	6	0.0001*	0.2358
FA*AU	2	0.2454	0.4173
ET*AU	3	0.0062*	0.0275
FA*AU*ET	6	0.0121*	0.1364

* Con diferencias significativas ($P \leq 0.05$). FA: Familia, ET: Etiolación, AU: concentración de Auxina, GL: Grados de Libertad, A: Altura de las plantas, DBT: Diámetro a la base del tallo de las plantas de *P. leiophylla*.

Entre familias el crecimiento de las plantas mostro diferencias significativas ($P \leq 0.05$), la familia 51, obtuvo mayores incrementos en altura, con respecto a las demás familias, en los tratamientos de etiolación si los afectó significativamente, aunque en el tratamiento de la auxina no hubo efectos (Figura 14A).

El diámetro para esta variable se encontró diferencias significativas entre familias y en la dosis de auxina, aunque sin efecto en los tratamientos de etiolación (Figura 14B). Aun no se han registrado trabajos en donde se evalué el efecto de la etiolación en el crecimiento de los mini-esquejes.

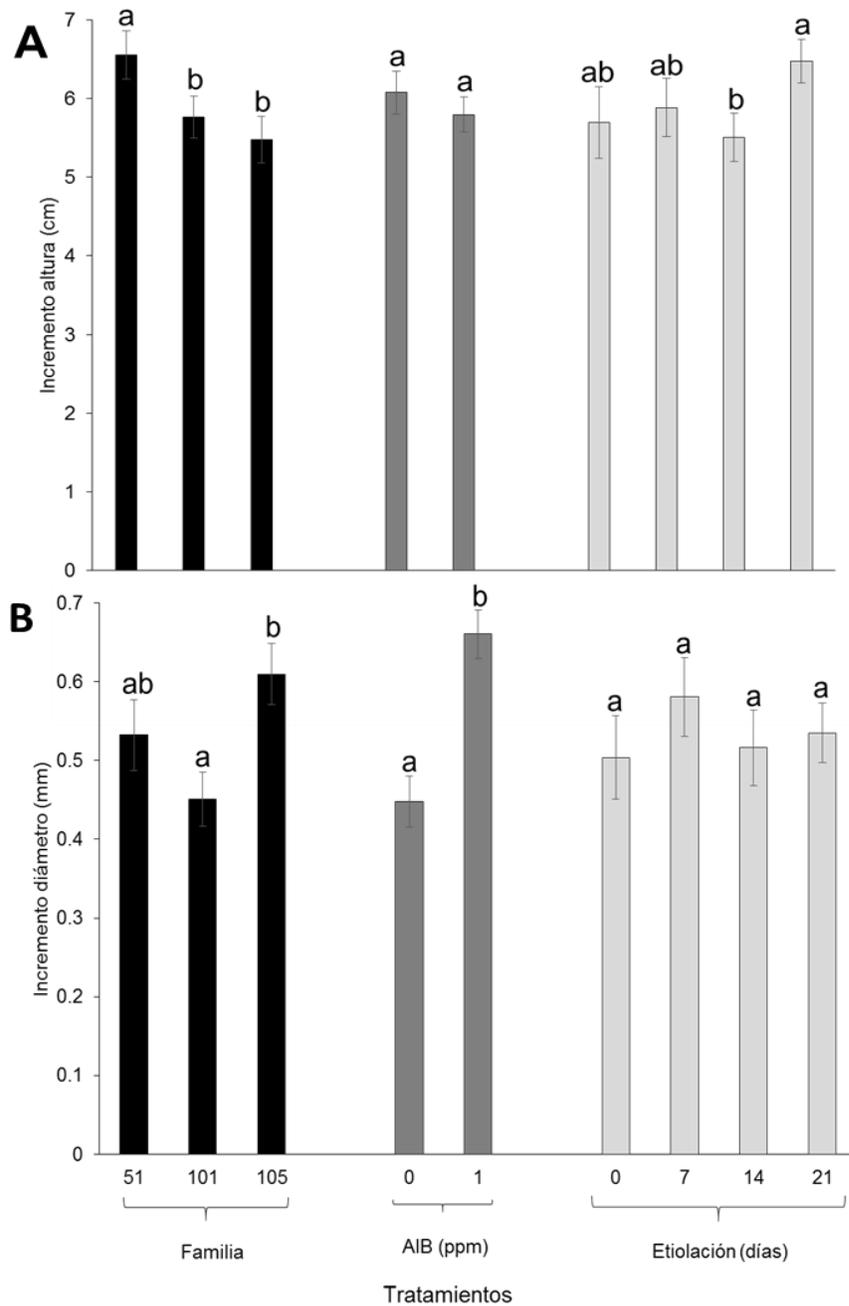


Figura 14. Características morfológicas de los mini-esquejes de *P. leiophylla*. Valores promedio \pm error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) A: incremento en altura de las plantas de *P. leiophylla*. B: incremento en diámetro de las plantas de *P. leiophylla*. 0= sin ácido indolbutírico, sin etiolación (testigo). 1: 5000 ppm de ácido indolbutírico.

3.4 CONCLUSIÓN

Los resultados indican que la familia 105 alcanzo más del 90% en cinco de sus tratamientos, y dos tratamientos con más del 50%; seguido de la familia 51, con tres de sus tratamientos al 100% de supervivencia y finalmente la 101 con dos de sus tratamientos al 100%; por otro lado en el enraizamiento sobresale de la misma manera la familia 105 con dos de sus tratamientos al 100 de enraizamiento; lo que muestra que un factor importante para la supervivencia es la etiolación y 5000ppm de dosis de AIB.

En cuanto al crecimiento de los mini-esquejes, se registran diferencias entre cada una de las familias.

3.5 LITERATURA CITADA

- Castillo, S. M., Cueva, V. D., Aguirre, N. M., & Günter, S. (2007). Propagación vegetativa de la familia Podocarpaceae. *Revista Bosque latitud cero*. 3: 3–5.
- Cuevas, J. J. C., Jiménez, C. M., Jasso, M. J., Pérez, P. R., López, U. J., & A. Villegas, M. (2014). Asexual propagation of *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. et Cham. *Revista Chapingo. Ciencias Forestales y del Ambiente* | Vol. XXI, núm. 1.
- Davis A.S., & Jacobs D. F. (2005). Quantifying root system quality of nursery seedlings and relationship to outplanting performance. *Revista New Forests*. 30:295–311.
- De Souza, A. V., Bender, A.G., Tivano, J.C., Barroso, G. D., Mroginski, A. L., Vegetti, A & Felker, P. (2014). Rooting of *Prosopis alba* mini-cuttings. *Revista New Forests*. 45: 745-752.
- Doll, U., Rodríguez, I., Soto, C., & Razmilic, I. (2012). Propagación de estacas y concentración de taninos y flavonoides en hojas de dos procedencias de *Ungi molinae* de la región de Maule (Chile). *Revista Bosque*. 33(2): 203–209.
- Brondani, G. E., Wendling, I., Brondani, B. E., Araujo A., López D. A., & Gonçalves A. N. (2012). Dynamics of adventitious rooting in mini-cuttings of *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 34(2): 169-178.
- Husen, A. (2008). Stock-plant etiolation causes drifts in total soluble sugars and anthraquinones, and promotes adventitious root formation in teak (*Tectona grandis* L. f.) coppice shoots. *Plant Growth Regul.* 54:13–21.

- Husen, A. (2011). Rejuvenation and Adventitious Rooting in Coppice-Shoot Cuttings of *Tectona grandis* as Affected by Stock-Plant Etiolation. *American Journal of Plant Sciences*.2: 370-374.
- Latsague, V. M., Sáez, D. P., & Yáñez, D. J. (2009). Efecto del ácido indolbutírico en la capacidad rizogénica de estacas de *Eucryphia glutinosa*. *Revista Bosque*. 30(2): 102–105.
- Li, S. W., Xue, L., Xu, S., Feng, H. & An, L. (2009). Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *The Botanical Review*. 75 (2): 230-247.
- Pacholczak. A., Szydło. W., & Lukaszewska. A. (2005). The effect of etiolation and shading of stock plants on rhizogenesis in stem cuttings of *Cotinus coggygria*. *Physiologiae plantarum*. 27(4): 417-428.
- Rapaka, V.K., Bessler,B., Schreiner, M., & Druege, U. (2005). Interplay between initial carbohydrate availability, current photosynthesis, and adventitious root formation in *Pelargonium* cuttings. *PlantSci*. 168,1547–1560.
- Rivero, M. G., Ramirez, M., Caraballo, B. & Guerrero, R. (2005). Enraizamiento de estacas de semeruco (*Malpighia emarginata* Sessé & Moc. ex DC). *Revista Facultad Agronomía*. 22:129-141.

- Ruiz García, R., Vargas Hernández, J. J., Cetina Alcalá, V.M., & Villegas Monter, A. (2005). Efecto del ácido indolbutírico (AIB) y el tipo de estaca en el enraizado de *Gmelina arborea* Roxd. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 28 (4): 319–326.
- SAS (Statistical Analysis System) Institute. (2002). SAS/STAT Computer Software. Release 9.00. SAS Institute Inc. Cary.
- Tao, Y., Ferrer, J.-L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J. A. (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent path-way is required for shade avoidance in plants. *Cell*.133, 164–176.
- Vallejos -Torres, G., González-Polar, L. E. T., & Arevalo- López. L. A. (2014). Enraizamiento de brotes de capirona *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex Schum., en la Amazonia peruana. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*. 11(27): 55–59.

5. CONCLUSIONES GENERALES

La fertilización incremento en un 10% el DCR de las plantas donadoras o setos de manera similar en las tres familias probadas de *P. leiophylla*. La fenología y crecimiento del brote se aceleró, en plantas de las tres familias, por el tratamiento de fertilización por un lapso aproximado de 7 días, con respecto a las plantas testigo. La fertilización amplificó la producción del NB en más de 30% en plantas podadas de las tres familias. El efecto de la fertilización no mostró interacción con la familia para la producción de NB. Por lo tanto, además de la poda de la planta donante o seto se recomienda la aplicación de fertilizantes para amplificar la producción de brotes, para acelerar los procesos de activación, desarrollo y crecimiento del brote.

A causa del alto porcentaje de humedad relativa, causó la muerte de gran cantidad de mini-esquejes de *P. leiophylla*, es recomendable mayor control en este factor así como en la temperatura. Los tratamientos de fertilización y de sombra incrementaron un 35% de enraizamiento en comparación con las demás familias con el mismo tratamiento.

La etiolación a 21 días, incrementa los porcentajes de enraizamiento y disminuye la inducción de callo en los esquejes de *P. leiophylla*. Al aplicar dosis de AIB a 5000 ppm, incrementa los porcentajes de enraizamiento. La familia 105 fue quien tuvo una mejor respuesta en la inducción de raíces, seguida de 51 y 101. La combinación entre la etiolación y la dosis de AIB, incrementa los porcentajes de enraizamiento Se recomienda la utilización de la técnica de etiolación, para el enraizado de mini-esquejes en *P. leiophylla*.