



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**INDUCCIÓN A ORGANOGÉNESIS DE *Heliocarpus appendiculatus*  
Turcz y *Trema micrantha* L. Blume EN SEMILLAS PROVENIENTES  
DE POBLACIONES NATURALES.**

**NATHALY DEL CARMEN SÁNCHEZ VILLEGAS**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO


2015

La presente **Tesis** titulada: “**Inducción a organogénesis de *Heliocarpus appendiculatus* Turcz y *Trema micrantha* L. Blume en semillas provenientes de poblaciones naturales**”. Realizada por la alumna: **Nathaly del Carmen Sánchez Villegas**, 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 PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TROPICO**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:



---

DR. ÁNGEL SOL SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:



---

DR. FRANCISCO JAVIER GABINO ROMAN

ASESOR:



---

DR. ROBERTO DE LA ROSA SANTAMARÍA

ASESORA:



---

DRA. OBDULIA BALTAZAR BERNAL

ASESORA:



---

DRA. ELIZABETA HERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ

H. Cárdenas, Tabasco, México a 29 de Julio de 2015

**“Inducción a organogénesis de *Heliocarpus appendiculatus* Turcz y *Trema micrantha* L. Blume en semillas provenientes de poblaciones naturales”.**

Nathaly del Carmen Sánchez Villegas, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2015

**RESUMEN**

El objetivo de este trabajo fue evaluar dos promotores de germinación ( $GA_3$  y  $KNO_3$ ) en semillas de *Trema micranthum* Blume y determinar el efecto de tres reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Trema micranthum* y *Heliocarpus appendiculatus* Turcz.

En *Trema micrantha*; las pruebas de germinación se realizaron con base en los resultados obtenidos en la cinética de imbibición, la cual, tuvo como resultado que el máximo tiempo de absorción y estabilización en la semillas fue después de las 15 horas de exposición, es por ello que; las semillas de esta especie se dejaron por 24 horas en los dos promotores de germinación; donde, el Ácido Giberélico tuvo mayor porcentaje de inducción a diferencia del Nitrato de Potasio.

Por otra parte la inducción a organogénesis en ambas especies se llevó a cabo con las plántulas que se obtuvieron de los resultados de germinación (el caso de *Trema micranthum*) y se seccionaron en tres utilizando hipocótilos y hojas cotiledonares y se colocaron en Espermidina, Kinetina y BAP a tres concentraciones diferentes, en donde los resultados obtenidos demostraron que no hubo diferencia significativa entre especies y tratamientos, sin embargo, estos variaron en poco porcentaje de acuerdo al tipo de especie con la que se trabajó.

**PALABRAS CLAVE:** Papel amate, promotores de germinación, organogénesis, Viabilidad

**Induction to organogenesis of *Heliocarpus appendiculatus* Turcz and *Trema micrantha* L. Blume in seeds from natural populations".**

Nathaly del Carmen Sánchez Villegas, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2015

**ABSTRACT**

The objective of this work was to evaluate two germination promoters (GA3 and KNO3) in *Trema micranthum* Blume seeds and determine the effect of three growth regulators in vitro propagation of *Trema micranthum* and *Heliocarpus appendiculatus* Turcz.

In *Trema micrantha*; germination tests were performed based on the obtained imbibitions kinetics, which, resulted in the maximum absorption and stabilization in seeds was after 15 hours of exposure that is why the seeds of this species were left for 24 hours in the two promoters of germination; where, it had the highest percentage Gibberellic Acid induction unlike potassium nitrate.

Moreover organogenesis induction in both species was carried out with seedlings that were obtained from the results of germination (*Trema micranthum*) and sectioned into three parts using hypocotyl and cotyledon leaves and placed in Spermidine, kinetin and BAP in three different concentrations. The results showed no significant statistical difference between species and treatments; however this little percentage varied according to the type of species with which we worked.

**KEYWORDS:** amate paper, germination promoters, organogenesis, viability.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el financiamiento en la realización y culminación del proyecto de investigación con el que se trabajó en mis estudios de maestría.

Al **Colegio de Postgraduados Campus Tabasco**, por la oportunidad que me dio para acceder a sus instalaciones para poder concluir una etapa más en mi vida profesional. A la **Unidad de Biotecnología Vegetal (UNIBVE), Acayucan, Ver.**, por el apoyo que me brindó para poder concluir los experimentos de laboratorio del proyecto.

A cada uno de los integrantes que formaron mi consejo particular; **Dr. Ángel Sol Sánchez, Dr. Roberto de la Rosa Santamaría, Dra. Obdulia Baltazar Bernal, Dr. Francisco Javier Gabino Román, Dra. Elizabeth Hernández Domínguez** por su tiempo y dedicación brindado en la elaboración y revisión de la tesis.

Al **Dr. Alejandro G. Nila Méndez** por el apoyo que me ha brindado en la estancia dentro de la UNIBVE.

A **Línea prioritaria de Investigación 8. Impacto y mitigación del cambio climático** del Colegio de postgraduados por el apoyo brindado para el desarrollo de la presente investigación.

## **DEDICATORIA**

### **A DIOS**

Por darme la fuerza y paciencia en toda mi vida, porque en cada etapa que he pasado me ha ayudado a brincar todos los obstáculos que aparecen.

Porque me ha enseñado que todo tiene un porque en la vida, porque me ha ayudado a tomar las mejores decisiones a pesar de los errores, porque de cada error hay un aprendizaje.

Por la dicha que me dio no solo de conocer a una excelente persona, sino también me dio la oportunidad de ser madre.

### **A MIS PADRES Y HERMANOS**

Por su sacrificio y esfuerzo, por el apoyo y cariño que me han brindado en cada una de las locuras que hago. Por la confianza que siempre depositan en mí en el desarrollo de mis estudios.

### **A MI FAMILIA**

A ti **Carlos**, por tu amor, cariño, comprensión y paciencia que me has brindado en los buenos y malos momentos, por darme la dicha de ser madre de un pequeño que me ha cambiado la vida. Por ser padre y madre a la vez cuando tuve que dedicarle tiempo y esfuerzo a la tesis.

A **Adrián** que llegó a darle un vuelco a mi vida, que me enseña día con día que todo es posible. Gracias porque hemos cambiado momentos de juego por estancias en la escuela. Porque me acompañó todo el tiempo cuando tuve que trabajar en el laboratorio. Sin duda eres lo mejor de mi vida.

A los muchos o pocos amigos que me han apoyado siempre, a mis compañeros de la maestría que hicieron más ameno el tiempo de clases, por los buenos momentos que vivimos y por cada aventura por la que tuvimos que pasar.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo general	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. HIPÓTESIS	3
3.1. Hipótesis particulares	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1. <i>Trema micranthum</i> L. Blume ( <i>Trema micrantha</i> )	4
4.2. <i>Heliocarpus appendiculatus</i>	6
4.3. Importancia económica de las especies de jonote “Papel amate”	7
5. PROBLEMÁTICA	10
5.1. Germinación, latencia y dormancia de las semillas	12
5.2. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE TEJIDOS VEGETALES COMO ALTERNATIVA A LA PROBLEMÁTICA	16
5.2.1. Micropropagación	16
5.2.2. Vías primordiales para la propagación asexual <i>in vitro</i>	17
5.3. COMPONENTES PARA LA REALIZACIÓN DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE TEJIDOS VEGETALES	19
5.3.1. Medios de cultivo	19
5.3.2. Fuente de carbono	20
5.3.3. Reguladores de crecimiento	20
6. JUSTIFICACIÓN	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1. Localización	23

7.2. Colecta del material biológico	23
7.3. Rompimiento de latencia en semillas de <i>Trema micranthum</i>	24
7.3.1. Imbibición de las semillas	24
7.3.2. Tinción con tetrazolio en embriones de <i>Trema micranthum</i>	24
7.3.3. Pruebas de Germinación	25
7.3.4. Evaluación del Ácido Giberélico y Nitrato de Potasio como promotores de germinación en <i>Trema micranthum</i>	26
7.4. Propagación <i>in vitro</i> de <i>Trema micranthum</i> y <i>Heliocarpus appendiculatus</i>	27
7.4.1. Medio de cultivo utilizado para la obtención de plántulas	27
7.4.2. Inducción a Organogénesis de <i>Trema micranthum</i> y <i>Heliocarpus appendiculatus</i>	29
8. RESULTADOS Y DISCUSION	31
8.1. Rompimiento de latencia en semillas de <i>Trema micranthum</i>	31
8.1.1. Imbibición de las semillas	31
8.1.2. Tinción con tetrazolio en semillas de <i>Trema micranthum</i>	32
8.1.3. Pruebas de Germinación	34
8.2. Inducción a Organogénesis de <i>Trema micranthum</i>	38
8.3. Inducción a Organogénesis de <i>Heliocarpus appendiculatus</i>	42
9. CONCLUSIONES	48
10. BIBLIOGRAFÍA	49



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Árbol; b) Fruto inmaduro y c) Frutos de <i>Trema micranthum</i> .....	5
Figura 2. a) Árbol; b) semillas; c) hojas y semillas de <i>Heliocarpus appendiculatus</i> ....	7
Figura 3. Elaboración del papel amate.....	9
Figura 4. Extracción de la corteza de árboles de jonote.....	11
Figura 5. Tipos del cultivo de tejidos vegetales.....	17
Figura 6. Mapa de ubicación del área de estudio.....	23
Figura 7. Prueba de imbibición de las semillas de <i>Trema micranthum</i> .....	24
Figura 8. Semilla (superior izquierda), testa de extracción de semillas (superior derecha), embrión (inferior derecha) de <i>Trema micranthum</i> .....	25
Figura 9. Desinfección en campana de flujo laminar para la siembra in vitro.....	26
Figura 10. Esquema de la elaboración del medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962).....	28
Figura 11. Equipo utilizado para la elaboración de medio de cultivo.....	28
Figura 12. Plántulas y explantes utilizados para la inducción de brotes.....	30
Figura 13. Ganancia de peso (g) en semillas de <i>Trema Micranthum</i> durante la imbibición.....	32
Figura 14. Tinción con tetrazolio al 0.5% con embriones de <i>Trema micranthum</i> a diferentes tiempos de exposición.....	33
Figura 15. Tinción con tetrazolio a diferentes tiempos de exposición:.....	34
Figura 16. Ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) en el porcentaje de germinación de <i>Trema micranthum</i> después de 27 y hasta 60 días.....	36
Figura 17. Nitrato de Potasio (KNO <sub>3</sub> ) en el porcentaje de germinación de <i>Trema micranthum</i> .....	37
Figura 18. Categorización de la viabilidad (germinación y latencia) y de la no viabilidad (ausencia de tinción con tetrazolio).....	38
Figura 19. Brotes de <i>Trema micranthum</i> .....	39
Figura 20. Brotes de <i>Trema micranthum</i> obtenidos en los diferentes reguladores de crecimiento.....	40
Figura 21. Porcentaje de brotes por explante de <i>Trema micranthum</i> .....	41
Figura 22. Inducción de brotes de <i>H. appendiculatus</i> .....	45

Figura 23. Porcentaje de brotes de *Heliocarpus appendiculatus* obtenido del día seis hasta el día treinta..... 46

Figura 24. Brotes por explante de *Heliocarpus appendiculatus*..... 47

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción taxonómica de <i>Trema micranthum</i> . .....	4
Tabla 2. Descripción taxonómica de <i>Heliocarpus appendiculatus</i> .....	6
Tabla 3. Tratamientos para promover la germinación de <i>Trema micranthum</i> durante 24 horas. ....	27
Tabla 4. Tratamientos para la inducción de brotes de <i>Trema micranthum</i> y <i>Heliocarpus appendiculatus</i> .....	29

## 1. INTRODUCCIÓN

El género *Heliocarpus* toma su nombre del griego, y significa “fruto en forma de sol”. También es conocido como burio, burio blanco y burio colorado en Costa Rica; cajetón (Guatemala); jonote, jonote blanco, jonote colorado (Veracruz, México), (Lay, 1949).

*Trema micrantha* es una especie arbórea que pertenece a la familia *Ulmaceae* y es conocida como jonote en la Sierra Norte de Puebla (Vázquez, 1988). Otros de los nombres comunes con los que es conocida esta especie son: capulín, yaco de cuero, checait, pellejo de vieja, guacimillo en Veracruz.

Los árboles de jonote son una especie botánica que en forma natural se encuentra en selvas húmedas y bosques de niebla (zona de transición entre selva húmeda y bosque templado).

Según Standley y Steyermark (1949), se considera que son originarias de México y de Centroamérica, comprende un grupo de árboles pertenecientes a diferentes géneros: *Heliocarpus appendiculatus* Turcz, *Trema micrantha* L. Blume, *Belotia*, *Meliosma*, *Robinsonella*, *Hampeae*, *Saurauia* y *Guazuma* entre otras (Hatchondo, 1987; Morales Ríos, 1999).

Se trata de árboles que comúnmente se desarrollan en claros de selvas, en sitios que han sido perturbados por actividades atropicas, por lo que se consideran como especies pioneras de la vegetación secundaria (Pennington y Sarukhán, 1988; Núñez *et al.*, 1997).

*Heliocarpus appendiculatus* y *Trema micrantha* son especies con las que actualmente se produce el 80% del papel amate en México (Bravo, 1995), y que sin embargo con el paso del tiempo se han comenzado a perder.

Es por ello que se planteó como una alternativa la inducción organogénica con ayuda de las técnicas de micropropagación.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Determinar el efecto de tres reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Trema micranthum* y *Heliocarpus appendiculatus*.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Evaluar la viabilidad de las semillas de *Trema micranthum* mediante el test de tetrazolio.
2. Evaluar el efecto del Ácido Giberélico y Nitrato de Potasio en la inhibición de la latencia en semillas de *Trema micranthum*.
3. Evaluar el efecto de la Bencilaminopurina (BAP), Kinetina y Espermidina en la inducción de la organogénesis a partir de hipocótilos y cotiledones de *Trema micranthum* y *Heliocarpus appendiculatus*.

### **3. HIPÓTESIS**

El uso de auxinas y citocininas a bajas concentraciones induce la organogénesis y en altas concentraciones induce la formación de callos.

#### **3.1. Hipótesis particulares**

1. La latencia que presentan las semillas de *Trema micranthum* puede ser inhibida con Ácido Giberélico, Nitrato de Potasio.
2. Es posible establecer un cultivo *in vitro* de *Trema micranthum* y *Heliocarpus appendiculatus*.

## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. *Trema micranthum* L. Blume (*Trema micrantha*)

*Trema micranthum* fue descrita por Roem y Schult Blume en 1856, es un árbol que llega a medir hasta 30 metros de altura, con un diámetro de alrededor de 70 centímetros, tiene una copa amplia y abierta que crea poca sombra. En la tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica de la especie.

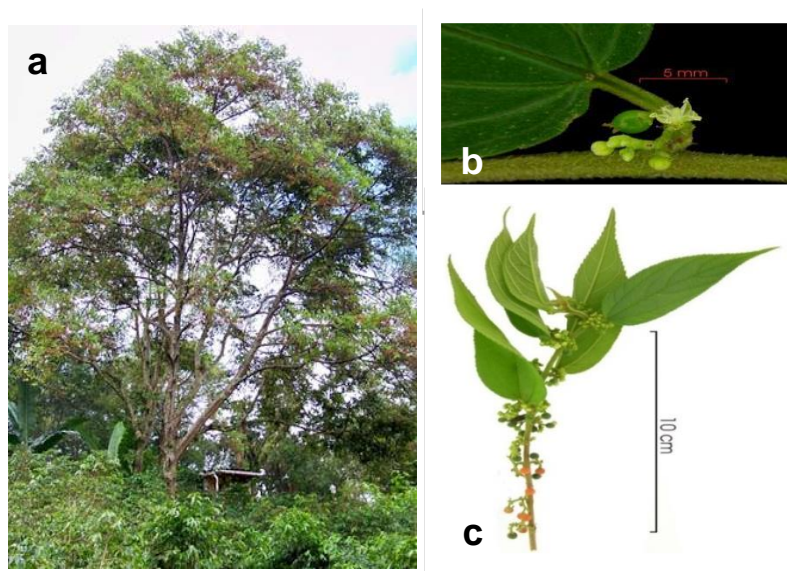
Sus hojas, tienen forma de punta de lanza con borde dentado y se encuentran alternadamente en delgadas ramas, las flores tienen una medida aproximada de 5 milímetros, con cinco pétalos de color verdoso y racimos pegados a las ramas.

**Tabla 1.** Descripción taxonómica de *Trema micranthum* (CONABIO, 2009).

<b>Clasificación taxonómica</b>	
<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Rosidae
<b>Orden</b>	Rosales
<b>Familia</b>	Ulmaceae
<b>Género</b>	<i>Trema</i>
<b>Especie</b>	<i>T. micranthum</i>

Fuente: CONABIO, 2009.

Los frutos son pequeños, de 2 milímetros de diámetro, color naranja brillante cuando están maduros; cada uno contiene una sola semilla de color negro con una medida de 1 milímetro (Figura 1). Una variedad de aves no identificadas se alimenta de los frutos del jonote, transportando las semillas a lugares lejanos del árbol madre, lo que facilita un amplio rango de dispersión (Ackerly, 1997).



**Figura 1.** a) Árbol; b) Fruto inmaduro y c) Frutos de *Trema micranthum*.

La corteza es suave y rojiza cuando el árbol es joven, pero a medida que madura va tomando una apariencia grisácea y granulosa (Cruz *et al.*, 2011). Es una especie endémica de selvas húmedas y bosques de niebla, se extiende desde el sur de Florida hasta el norte de Argentina. En México, está presente desde 0 hasta 1 500 msnm, atravesando por ecosistemas de selvas perennes en zonas bajas y selvas medianas, hasta zonas semialtas en los bosques mesófilos de montaña, aunque es más frecuente encontrarlo en las planicies costeras del Golfo de México, donde su distribución es muy alta (Ackerly, 1997).



#### 4.2. *Heliocarpus appendiculatus*

Descrita por Carlos Linneo (Tabla 2), es un árbol mediano, que alcanza hasta los 25 m de altura y 70 cm de diámetro (CONABIO, 2009).

**Tabla 2.** Descripción taxonómica de *Heliocarpus appendiculatus*

<b>Clasificación taxonómica</b>	
<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subreino</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclase</b>	<i>Dilleniidae</i>
<b>Orden</b>	<i>Malvales</i>
<b>Familia</b>	<i>Malvaceae</i>
<b>Subfamilia</b>	<i>Grewioideae</i>
<b>Género</b>	<i>Heliocarpus L.</i>
<b>Especie</b>	<i>H. appendiculatus Turcz</i>

Fuente: CONABIO, 2009

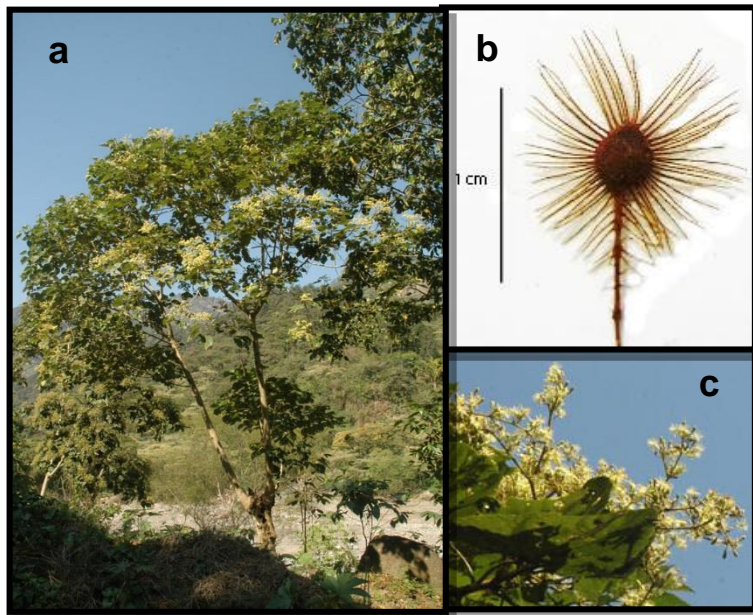
Las flores, en panículas densas, son hermafroditas o pistiladas, pediceladas, cremosas, amarillas o amarillo-verdosas, tetrámeras o pentámeras; el cáliz es valvado (Croat, 1978).

Las inflorescencias son cimas axilares o terminales, con varias flores actinomorfas y aromáticas.

El fruto es capsular de color rojizo, con tricomas estrellados en las superficies laterales y márgenes con dos hileras de cerdas plumosas, es indehiscente y contiene 1-3 semillas (Fundecor, 2001).

La corteza es lisa o fistulada, grisácea o pardusca, exfoliante; la corteza interna es cremosa o amarillenta, dulce y muy fibrosa. La savia es transparente, mucilaginosa y pegajosa (Mostacedo, 1997).

El jonote (Figura 2) presenta una alta plasticidad a nivel morfológico y celular, dependiente del tipo de vegetación en el que se desarrolla y en función de cambios climáticos y microclimáticos (Morales, 1999).



**Figura 2.** a) Árbol; b) semillas; c) hojas y semillas de *Heliocarpus appendiculatus*.

Fuente: CONABIO (2009)

#### 4.3. Importancia económica de las especies de jonote “Papel amate”

Al igual que todas las especies, *Trema micranthum* y *Heliocarpus appendiculatus* tienen un uso principal y desde hace tiempo son reconocidas porque, son la fuente primaria para la elaboración del “papel amate” una artesanía típica de México, por lo cual han comenzado a presentar una gran demanda para la elaboración del papel.

La historia del papel amate, inicia con su nombre, esta palabra *amate* se deriva del término náhuatl *amaquahuitl* (*amat* que significa papel; *quahuitl* que significa árbol), que se traduce como árbol de papel (Marentes, 1995).

El papel amate se elabora con la corteza interna (floema secundario) de especies de árboles tropicales cuyas cortezas deben ser de fácil extracción y tener fibras cortas. Su origen es precolombino y se encuentra fuertemente ligado a los rituales practicados por varias comunidades mesoamericanas (Down, 1982).

Se usaba como tributo y formaba parte de la vida religiosa y cultural de las poblaciones mesoamericanas. Se empleaba para escribir los Tonalámatl o calendarios, libros, mapas, cronologías e infinidad de códices, etc. (Marentes, 1995; Barrón, 2007).

Al inicio de la Colonia, la manufactura fue prohibida; sin embargo, algunas comunidades como San Pablito en la sierra Norte de Puebla, habitada por los ñahñus (Otomíes), han mantenido el uso y producción de papel amate hasta nuestros días (López, 2004).

En la década de los 60s, con la investigación antropológica sobre los rituales ñahñus en San Pablito y la intervención de galeristas de la ciudad, atrajeron la atención hacia el papel amate impulsando su producción y venta como artesanía (Down, 1982).

En pocos años, esta nueva artesanía cobró gran popularidad provocando cambios en la organización para su producción, en las técnicas de manufactura y aumentó la presión sobre los recursos naturales empleados para su elaboración (Figura 3). Antes de que el papel amate se transformara en artesanía, los pobladores de San Pablito recolectaban la corteza que utilizaban para su manufactura; en la actualidad, son adquiridas a través de los jonoteros de otras comunidades dedicadas a la extracción y venta (López, 2004).



**Figura 3.** Elaboración del papel amate. a) Lavado de las fibras que fueron hervidas; b) Después del lavado de las fibras se extienden sobre una tabla de madera; c, d) se golpean con una piedra volcánica para formar pliegos; e) Secado y desprendimiento de las hojas (López, 2009).

Fuente: CONABIO, 2009

La producción de papel en San Pablito se ha diversificado extraordinariamente. Las rutas de innovación incluyen una gran diversidad de formas, estilos y mezclas de distintos tipos de materiales, diferentes cortezas de árboles (jonote blanco y rojo), papel picado, aplicaciones de bordados tradicionales de hilo, chaquira y la apertura a una infinidad de usos (López, 2004).

## 5. PROBLEMÁTICA

La producción de papel amate conlleva muchos factores; desde representar una importante alternativa económica para los habitantes de San Pablito, hasta incrementar la demanda de esta artesanía, como consecuencia ha aumentado el número de especies que son usadas para la elaboración de papel amate y los métodos de procesamiento de las fibras (Marentes, 1995).

Desde que se utiliza el jonote tanto rojo como blanco para la producción de papel, la extracción de su corteza es total, provocando después la muerte de los árboles. Esto ha llevado en primer lugar a disminuir la cantidad de especies silvestres de este lugar, lo que ha motivado por lo tanto, la extracción de la corteza de otros árboles en otros estados del país.

La extracción de corteza no es una actividad regulada y por consiguiente, se transportan de manera ilegal hasta San Pablito para continuar con la fabricación de esta artesanía.

Como se ha reportado, el jonote tanto blanco como rojo se encuentran asociado al manejo tradicional e integral de la sombra que necesitan los cafetales, por lo tanto los productores de café ahora se suman a esta otra actividad silvícola (Figura 4).



**Figura 4.** Extracción de la corteza de árboles de jonote.

Fuente: CONABIO, 2009

La extracción de corteza del jonote, en semejanza a otros casos de productos forestales no maderables, revela los vacíos que existen entre las normas y la manera en la que ciertos recursos biológicos son manejados. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 005-SEMARNAT-1997, el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de cortezas, tallos y plantas completas requieren autorización. En este caso, los jonoteros estos pueden llegar a ser sancionados por transportar las cargas de corteza.

Si bien el arraigo histórico de este producto cultural, y el uso de la corteza del jonote han hecho posible la persistencia de la producción del papel amate como artesanía, ésta refleja las difíciles condiciones de subsistencia en el ámbito rural y en particular, en el uso de productos forestales no maderables (SEMARNAT, 1997).

Debido a que los árboles para la producción de papel amate son completamente descortezados y a que la distribución de *H. appendiculatus* y *T. micranthum* están

limitadas y dispersas en los bosques, la extracción de corteza pone en riesgo estas especies.

En el caso de *T. micranthum*, desde los 80's se ha observado que las poblaciones se han reducido en algunos sitios de distribución natural (Torres, 1996). Este efecto negativo de la extracción disminuye gradualmente conforme a la distancia de San Pablito. En general, se ha observado que la demanda de corteza es mayor que la capacidad de regeneración de estas especies.

Por otro lado, se debe mencionar que cuando la extracción se realiza a partir de corteza regenerada, la calidad de esta corteza ya no es apta para manufacturar papel amate debido a su dureza. Otro de los problemas, que se presenta es el retardo en la germinación de las semillas particularmente de *Trema micranthum* (Torres, 1996).

Uno de los aspectos más relevantes que se debería tomar en cuenta para la producción de papel amate es la propagación y/o regeneración de las poblaciones de árboles de jonote blanco - rojo, y consecuentemente, establecer un plan de manejo forestal integral para el suministro de la corteza.

### **5.1. Germinación, latencia y dormancia de las semillas**

El proceso de la germinación, ha sido dividido en tres fases: en la primera ocurre la imbibición de la semilla, que consiste en la absorción del agua necesaria para la rehidratación de las proteínas celulares, así como para el transporte y las reacciones hidrolíticas; en la segunda etapa, se produce la activación del metabolismo (o germinación sensu stricto), donde ocurre la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas; con incremento en la actividad enzimática y en la tercera fase, ocurre la emergencia de la radícula (Herrera *et al.*, 2006; Fenner *et al.*, 2006; Bewley, 1994).

La germinación está condicionada tanto por factores ambientales como por características genéticas de las especies, que determinan los procesos de desarrollo,

morfología y fisiología de las semillas; con alusión a diversos estudios; la luz, temperatura y humedad relativa que son factores importantes para la germinación de las simientes (Ramírez *et al.*, 2007).

Las semillas se pueden clasificar en dos tipos principalmente (Roberts 1973):

**a) Ortodoxas:** Semillas que pueden adquirir tolerancia a la deshidratación durante su desarrollo y almacenarse perfectamente a temperaturas bajas o inferiores a 0°C durante largos períodos.

Por lo general, estas semillas pasan por un periodo de secado durante su maduración y se desprenden bajo un contenido de humedad, el cual está en equilibrio con la humedad relativa (RH), el equilibrio del contenido de agua a cualquier RH en particular (Roberts, 1976).

En este caso, pertenecen a este grupo importantes géneros de árboles forestales como por ejemplo; *Pinus*, *Picea*, *Eucalyptus*, *Tectona grandis*, *Populus*, *Salix*, *Ulmus* y *Cedrela odorata* entre otros.

**b) Recalcitrantes:** Semillas pasan por un corto o ningún secado de maduración y permanecen sensibles a la deshidratación, tanto en su desarrollo como después de su desprendimiento que no pueden sobrevivir si se las seca más allá de un contenido de humedad relativamente alto (en un intervalo de 20 - 50 %) y que no toleran el almacenamiento durante largos períodos. Esto implica que los procesos que confieren tolerancia a la deshidratación, son variables desarrolladas o expresadas en una condición no ortodoxa (Berjak, 1997).

Es interesante, mencionar que las especies recalcitrantes sean en su mayoría especies leñosas (*Quercus*, *Castanea*, *Hevea*, *Swietenia*, *Terminalia* y *Triplochiton*, entre otras).



Aunque, las semillas de muchas especies forestales pueden germinar enseguida cuando se las somete a unas condiciones de humedad y temperatura favorables.

Existen también muchas otras especies poseen un determinado grado de latencia de la semilla. Con relación a la latencia de las semillas, Baskin (1998) especifica que, en poblaciones naturales ésta, previene la germinación durante épocas con condiciones desfavorables, lo cual permite su sobrevivencia durante períodos largos, en espera de condiciones apropiadas y, facilita la tolerancia a ciertas perturbaciones como es el fuego; con adición, etc. (Martínez, *et al.* 2008).

En particular, en el sector forestal se utiliza la palabra latencia, que proviene del latín “latensis” y significa oculto, escondido o aparentemente inactivo para referirse a esta incapacidad de la semilla a germinar, la cual puede constituir un problema por ejemplo para los programas de producción de plántulas en vivero.

La latencia se establece durante la formación de la semilla, y posee una importante función que consiste en restringir la germinación en la planta madre antes de su dispersión en el campo. Además, Baskin y Baskin (1998), relacionaron algunos causales de latencia, los cuales incluyen: embriones no desarrollados, testas seminales duras impermeables al agua y sustancias químicas inhibidoras de la germinación.

Con base en el esquema anterior, Baskin y Baskin (1998, 2004) desarrollaron una categorización del fenómeno, la cual incluye cinco clases de ella:

- 1. Latencia Fisiológica**, la cual, en el caso de que sea profunda, precisa de procesos de estratificación en frío o en caliente, para su remoción y cuando es leve, puede eliminarse a través de la aplicación de giberelinas;
- 2. Latencia Morfológica**, ésta es evidente en semillas con embriones diferenciados, con desarrollo reducido en cuanto a su tamaño; estos requieren de un tiempo para crecer y germinar (Jacobsen y Pressman, 1979; Finch y Leubner, 2006);

3. **Latencia Morfo-fisiológica**, en la cual las semillas, además de presentar embriones con desarrollo escaso, tienen el componente fisiológico de bloqueo de la germinación (Baskin y Baskin, 2004); estas requieren de estratificación caliente o fría, la cual, en algunos casos se sustituye por la aplicación de giberelinas (Finch y Leubner, 2006);
4. **Latencia Física**, causada por la presencia de células de empalizada, en la semilla, impermeables al agua; la liberación de ella se logra a través de escarificación mecánica o química de la simiente (Baskin y Baskin, 1998; Baskin, 2003; Finch y Leubner, 2006);
5. **Latencia Físico- Fisiológica**, presente en semillas con capas impermeables al agua, combinada con la fisiológica.

Con lo antes descrito, se debe mencionar que existen antecedentes, de algunos autores como Rueda, (2010); Figueroa, *et al.*, (2002) que se han enfocado primordialmente sobre la germinación, crecimiento y sobrevivencia de *H. appendiculatus* y *T. micranthum*. Ellos han reportado que las semillas de *H. appendiculatus* presentan un tipo de latencia termorregulada, la cual es interrumpida cuando las semillas son sometidas a cambios bruscos de temperatura.

En el caso de *T. micranthum* presenta porcentajes de supervivencia de aproximadamente 67% durante 6 meses posteriores al siembra, para ambas especies se requiere espacios abiertos con poca cobertura.

Esto ha hecho que se proponga a *T. micranthum* como una especie pionera en los sitios deforestados (Vázquez, 1998; Rodríguez *et al.*, 2004).

Bajo estos antecedentes, cuando las semillas tiene una latencia fuerte como parece ser el caso de *H. appendiculatus* y *T. micranthum*, la regeneración artificial exige de

manera esencial alguna forma de tratamiento previo de la semilla, a fin de obtener una tasa de germinación razonablemente alta en poco tiempo.

Con la finalidad de interrumpir la latencia, acelerar la germinación y propagar masivamente estas especies, se propone el establecerlas en cultivo *in vitro*, objetivo del presente trabajo.

## **5.2. CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS VEGETALES COMO ALTERNATIVA A LA PROBLEMÁTICA**

Debido a las grandes dimensiones de las especies y a los procesos de reproducción, comunes a las especies leñosas, la biotecnología ofrece una serie de técnicas para superar las limitaciones biológicas convencionales; estas técnicas incluyen el cultivo de células, la micropropagación, selección genotípica *in vitro*, conservación *in vitro* y un gran número de nuevas tecnologías en el campo de la genética molecular (Sánchez *et al*, 1999).

El cultivo de tejidos es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un “genotipo selecto” y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencialidad que tienen las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados. Se le llama *in vitro* debido a que se cultiva en recipiente de vidrio o plástico transparente bajo condiciones controladas (Hurtado, 1987).

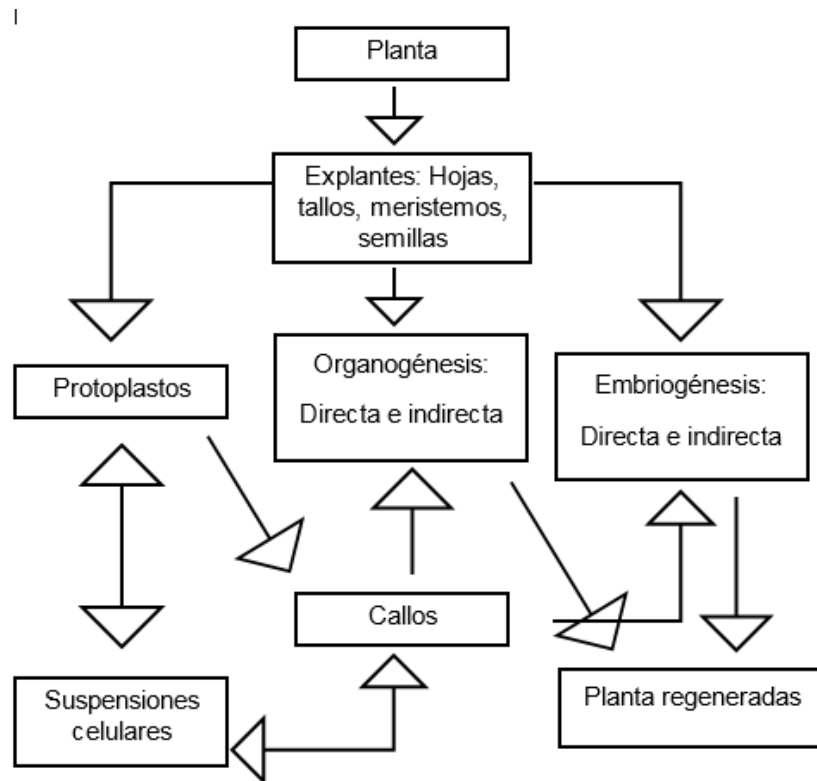
### **5.2.1. Micropropagación**

Consiste en la propagación de un genotipo de interés a gran escala a través del empleo de las técnicas del cultivo de tejidos. Este cultivo es una herramienta útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad

uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada en condiciones artificiales (Debergh, 1993; Olmos *et al.*, 2004).

### 5.2.2. Vías primordiales para la propagación asexual *in vitro*

Existen diferentes formas del cultivo de tejidos vegetales (Figura 5) (Hurtado, 1987).



**Figura 5.** Tipos del cultivo de tejidos vegetales. Tomado de Hurtado y Merino, 1987 y modificado por Sánchez-Villegas, 2014.

#### 5.2.2.1. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979). Esto no es un fenómeno artificial y es conocido en la naturaleza como una forma de apomixis llamada embrionía adventicia, descrita por primera vez por Strasburgues en 1878 aunque fueron Reinert (1958) y Steward *et al.* (1958) quienes descubrieron e identificaron por primera vez la embriogénesis somática.

Este método, hasta ahora es de los más eficientes para la producción masiva de plantas *in vitro* debido a la naturaleza bipolar del embrión, la posibilidad de ser automatizado todo el proceso productivo, los altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo, al poder aplicarse los principios de la cinética microbiana y la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales.

#### **5.2.2.2. Organogénesis**

El término organogénesis se refiere al proceso de diferenciación a través del cual órganos vegetales como raíces, brotes, yemas florales, etc., son formados a partir de explantes cultivados (Chawla, 2004).

La regulación *in vitro* para promover la organogénesis fue demostrada por Skoog y Tsui desde 1948 utilizando callos de Tabaco, Skoog y Miller en 1957, complementaron la participación hormonal de dicho fenómeno, y desde entonces el tabaco ha sido utilizado como modelo para los estudios morfogénéticos sobre la regeneración de plantas a partir de tejidos y células (Gaba, 2005).

Entre los órganos que se pueden formar están las raíces o los brotes adventicios, los cuales son estructuras muy similares a una yema y tienen la capacidad de originar una nueva planta después de elongarse y formar raíces. La organogénesis es más común que la embriogénesis somática y tiene un gran potencial para la propagación clonal masiva de plantas.

De acuerdo a Chawla (2004), la producción de plantas a través de la organogénesis se lleva a cabo por dos vías: 1) La aparición de órganos adventicios directamente del explante y 2) organogénesis a través de la formación de callo.

**Organogénesis Directa:** Los tejidos somáticos de plantas superiores son capaces, bajo ciertas condiciones, de regenerar raíces adventicias. Los brotes adventicios son los que surgen directamente del explante sin pasar por la fase de callo.

**Organogénesis Indirecta:** La organogénesis indirecta, consiste en la regeneración de plantas a partir del explante en cultivo implicado en la formación de callo y su posterior diferenciación en brotes que al individualizarse se consolidan como plantas completas.

### **5.3. COMPONENTES PARA LA REALIZACIÓN DEL CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS VEGETALES**

Para llevar a cabo el cultivo de tejidos vegetales se cuentan con algunos componentes como el medio de cultivo y los reguladores de crecimiento.

#### **5.3.1. Medios de cultivo**

Los requerimientos nutritivos para un crecimiento exitoso varían con la especie, la parte de la planta que se esté cultivando y con la respuesta que se desee obtener, es por ello que se han creado diversos medios de cultivo cuyas diferencias estriban en las cantidades y tipos de compuestos empleados.

Los componentes de los medios de cultivo generalmente se agrupan en cinco clases de compuestos: a) macro y micro elementos; b) fuentes de carbono, generalmente sacarosa; c) vitaminas; d) nitrógeno reducido, y e) reguladores del crecimiento (Villalobos *et al.*, 1984).

El primer objetivo en la preparación de un medio de cultivo es suministrar los nutrimentos minerales en concentraciones adecuadas, se deben incluir los macro elementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca, y Mg) y los micro elementos (B, Zn, Cu, Mo, Fe, Cl); pero, para determinar la formulación adecuada, que le brinde al tejido la mejor

oportunidad de desplegar su capacidad intrínseca para crecer, se debe hacer a través de la experimentación (Roca, 1991).

### **5.3.2. Fuente de carbono**

Los azúcares son productos de la fotosíntesis de las plantas, proceso por medio del cual la planta convierte el dióxido de carbono y agua en carbohidratos con la ayuda de la clorofila y la luz. Sin embargo, las plantas que crecen *in vitro* debido a la baja intensidad lumínica no pueden fabricar el azúcar que requieren, por lo que es necesario adicionar sacarosa al medio de cultivo, la cual es más utilizada para propósitos de micropropagación. Generalmente se usan concentraciones de 1%-6% de sacarosa en el medio de cultivo, aquí es convertida rápidamente en glucosa y fructosa; la glucosa es la que primero se utiliza seguida de la fructosa. El azúcar blanco refinado, puede resultar adecuado para la micropropagación en muchos casos. Se trata de un producto purificado y de acuerdo con los análisis se compone de 99,94% de sacarosa, 0,02% de agua y 0,04% de otras sustancias (no hay indicaciones de que estas últimas puedan causar toxicidad *in vitro*) (Pierik, 1990).

### **5.3.3. Reguladores de crecimiento**

Las fitohormonas pueden promover o inhibir determinados procesos. Dentro de las que promueven una respuesta existen 3 grupos principales de compuestos naturales, cada uno de los cuales con propiedades de regulación del crecimiento en plantas: auxinas, giberelinas, citocininas (García, 2000).

En la mayoría de los casos los medios utilizados para el establecimiento de los cultivos contienen auxinas (Ácido indolacético (IAA), 2,4-D, Dicamba, Ácido indolburtírico (IBA), Picloram, etc), citocininas (Thidiazurón, BA, CIN, ZEA, 2iP,). Las giberelinas (especialmente GA<sub>3</sub>) son requeridas en algunas ocasiones para el cultivo de meristemas o para la elongación de brotes (Roca, 1993).

### **5.3.3.1. Auxinas**

Las auxinas son hormonas vegetales naturales que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de las plantas. Otras formas naturales de auxinas son el ácido 4-cloro-indolacético (4-ClIAA), ácido fenilacético (PAA), IBA y el ácido indol propiónico (IPA; Ludwig, 2002).

### **5.3.3.2. Giberelinas**

Las giberelinas se utilizan en varios procesos de desarrollo en vegetales. A pesar de ser más de 100 el número descubierto en plantas, sólo son unas pocas las que demuestran actividad biológica. Su descubrimiento en plantas se remonta a la época de los 30s, cuando científicos japoneses aislaron una sustancia promotora del crecimiento a partir de cultivos de hongos (Malonek *et al.* 2005).

### **5.3.3.3. Citocininas**

Esenciales en diferentes procesos vinculados al crecimiento y desarrollo de las plantas y relacionados a la acción de varios genes.

Se trata de derivados de la base adenina. El reconocimiento de las citocininas como reguladores de crecimiento se inició con el descubrimiento de la kinetina en la época de los 50s. Su efecto hormonal fue visualizado rápidamente al inducirse, en compañía de auxina, diferentes tipos de morfogénesis en tejidos de tabaco y de otras especies bajo condiciones *in vitro* (Skoog & Miller 1965).



## 6. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo de investigación surgió porque hasta la fecha no hay investigaciones sobre el cultivo *in vitro* de las dos especies estudiadas (*Trema micranthum* y *Heliocarpus appendiculatus*) y en conjunto con la creciente demanda en extracción de la corteza de los árboles de jonote para la producción de papel, actividad económica de gran importancia para los artesanos de San Pablito Pahuatlán en la Sierra Norte de Puebla.

Aun cuando, se tiene una amplia distribución natural y especial abundancia en cafetales por ser especies que dan sombra, existe la extracción ilegal de esta corteza por parte de artesanos enfrentando un desabasto en esta materia prima. Haciendo, que los jonoteros se extiendan a otros estados e induciendo el tráfico ilegal de corteza del jonotero, por ejemplo descortezado los árboles que se encuentran en las zonas cafetaleras del vecino estado de Veracruz.

Es por ello es que en base estos problemas, se buscaron alternativas de solución, entre ellas el uso de la micropropagación, la cual despliega una gama enorme de herramientas como el cultivo *in vitro*, cuyo fin es la de propagar clonalmente y masivamente arboles de jonote para contar con más individuos que ayuden a sostener la demanda en la materia prima para la elaboración de esta artesanía.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Localización

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (UNIBVE) en el Instituto Tecnológico Superior de Acayucan, ubicado en la carretera costera del golfo, km. 216.4, col. Agrícola Michapan, Acayucan, Veracruz (Figura 6).



**Figura 6.** Mapa de ubicación del área de estudio.

### 7.2. Colecta del material biológico

Se colectaron frutos maduros que fueron extraídos de árboles jóvenes de *Trema micranthum* y *Heliocarpus appendiculatus* en Mayo y Octubre del 2012 y 2013 en la región de los Tuxtlas.

A estos frutos se les retiró la pulpa por abrasión, empleando una licuadora de uso doméstico, posteriormente la humedad fue eliminada con papel adsorbente y expuestas a una corriente de aire seco. Las semillas secas se almacenaron en cajas Petri a temperatura ambiente.

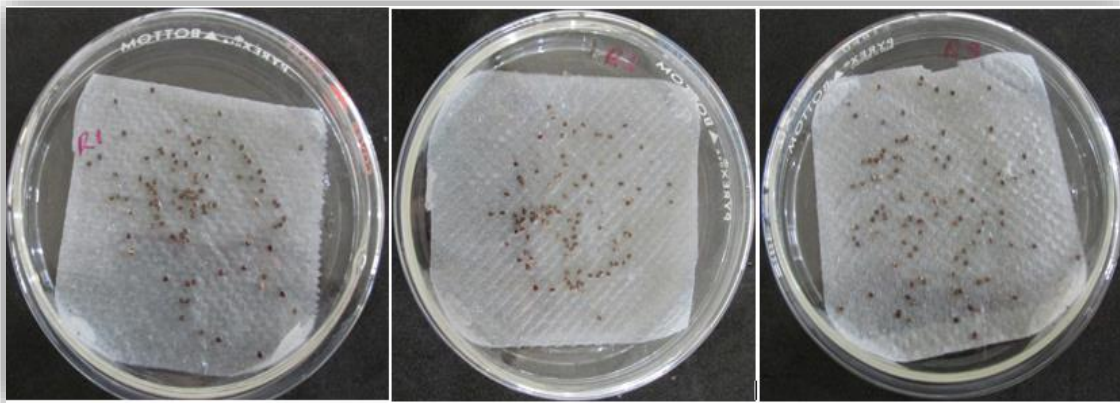
### 7.3. Rompimiento de latencia en semillas de *Trema micranthum*

Los experimentos fueron divididos en tres etapas:

- 1) Imbibición de semillas,
- 2) Prueba de tetrazolio,
- 3) Pruebas de germinación.

#### 7.3.1. Imbibición de las semillas

Las pruebas se realizaron para la determinación de permeabilidad de las semillas al agua. El experimento se realizó con tres repeticiones con 100 semillas cada una. El ensayo se realizó en cajas Petri y papel absorbente saturado con agua destilada, a temperatura ambiente (Figura 7), se registró la ganancia de peso a 0, 1, 2, 4, 8, 24 horas. Los pesos fueron estimados en una balanza analítica Denver®. Antes de registrar el peso se eliminó el agua superficial con la ayuda de papel absorbente y posteriormente se registró el peso de cada una de las repeticiones.



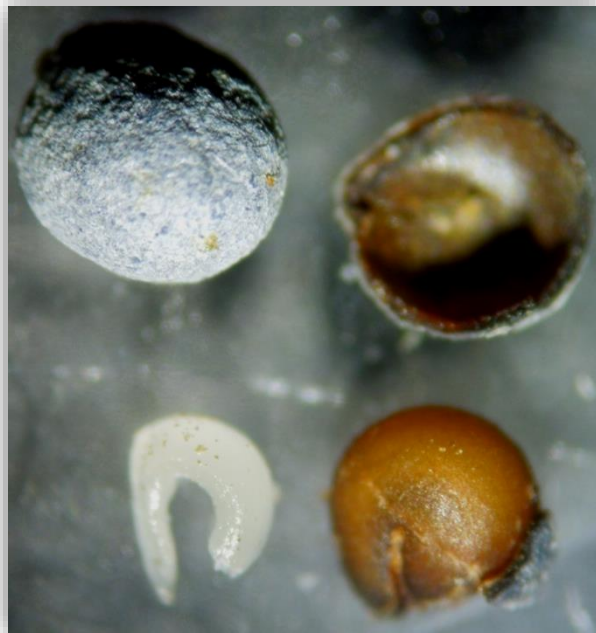
**Figura 7.** Prueba de imbibición de las semillas de *Trema micranthum*.

#### 7.3.2. Tinción con tetrazolio en embriones de *Trema micranthum*

Para el test de tetrazolio fue necesaria la extracción del embrión, para ello, con ayuda de una pinza se aplicó presión sobre las semillas con el objetivo de romper la testa (Figura 8), seguido a ello se colocaron los embriones en agua destilada a temperatura

ambiente, posteriormente con ayuda de un bisturí y una pinza para disección se eliminó el resto de la testa hasta la obtención completa del embrión.

Se modificó el protocolo de Hernández, 2009 para la tinción de embriones de *Trema micranthum*. Para ello, los embriones se sumergieron en soluciones de cloruro de 2, 3, 5 trifeniltetrazolio (tetrazolio) a 0.5% y 1.0% durante 1, 3 y 24 h a temperatura ambiente, bajo condiciones de oscuridad empleando un testigo para observar la tinción. El protocolo de tinción fue aplicado a 10 embriones con 2 réplicas.



**Figura 8.** Semilla (superior izquierda), testa de extracción de semillas (superior derecha), embrión (inferior derecha) de *Trema micranthum* para las pruebas de tinción.

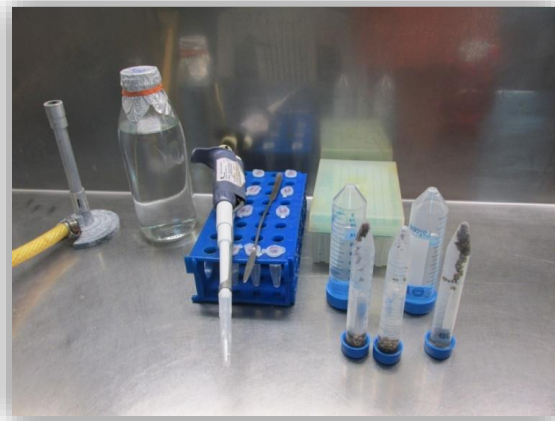
### **7.3.3. Pruebas de Germinación**

Las semillas que se utilizaron fueron previamente expuestas a un protocolo de desinfección, el cual se llevó a cabo de la siguiente manera:

#### **7.3.3.1. Desinfección de las semillas**

Se preparó el material *ex vitro* para introducirlo a *in vitro* mediante un protocolo de desinfección establecido y modificado de acuerdo a las especies (Domínguez, 2008).

Las semillas fueron colocadas en una solución fungicida ( $2 \text{ gl}^{-1}$  de Captan,  $2 \text{ gL}^{-1}$  de manzate (mancozeb®),  $2 \text{ gl}^{-1}$  terramicina) durante 12 horas. Finalizado el tiempo se desechó la solución y fueron lavadas con agua estéril y destilada, para retirar el exceso de antifúngicos, posteriormente se colocaron en una solución de antioxidantes (ácido ascórbico y ácido cítrico) por 30 minutos y fueron transferidas a la campana de flujo laminar en donde se le retiraron los antioxidantes y fueron colocadas en una solución de hipoclorito de sodio al 10% (cloralex®) durante 20 minutos, seguido a ello se eliminó dicha solución y se adicionó  $\text{H}_2\text{O}_2$  50% por 1 minuto y finalmente se expusieron en alcohol al 70% por 10 minutos una vez finalizado el protocolo fueron lavadas con agua desionizada y estéril hasta retirar el exceso de todas las soluciones (Figura 9).



**Figura 9.** Desinfección en campana de flujo laminar para la siembra *in vitro*.

#### **7.3.4. Evaluación del Ácido Giberélico y Nitrato de Potasio como promotores de germinación en *Trema micranthum***

Finalizado el protocolo de desinfección, las semillas se colocaron en tubos eppendorf los cuales contenían una solución de ácido giberélico o nitrato de potasio a tres concentraciones diferentes (Tabla 3), cada tubo contenía al menos 20 semillas, y después se colocaron al menos cinco semillas por frasco, este experimento se realizó por triplicado. Transcurrido el tiempo de imbibición de las semillas (24 horas), estas fueron sembradas en medio MS (Murashigue y Skoog, 1962) y se colocaron en el cuarto de incubación bajo condiciones controladas de fotoperiodo de 16-8 horas

luz/oscuridad, intensidad luminosa de  $140\mu\text{M m s}^{-1}$  con una temperatura de  $25\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ , y humedad relativa del 40% hasta su germinación.

**Tabla 3.** Tratamientos para promover la germinación de *Trema micranthum* durante 24 horas.

<b>Tratamiento</b>	<b>Reguladores de crecimiento [mg l<sup>-1</sup>]</b>
<b>1</b>	GA <sub>3</sub> 500
<b>2</b>	GA <sub>3</sub> 1000
<b>3</b>	GA <sub>3</sub> 2000
<b>4</b>	KNO <sub>3</sub> 500
<b>5</b>	KNO <sub>3</sub> 1000
<b>6</b>	KNO <sub>3</sub> 2000

#### **7.4. Propagación *in vitro* de *Trema micranthum* y *Heliocarpus appendiculatus***

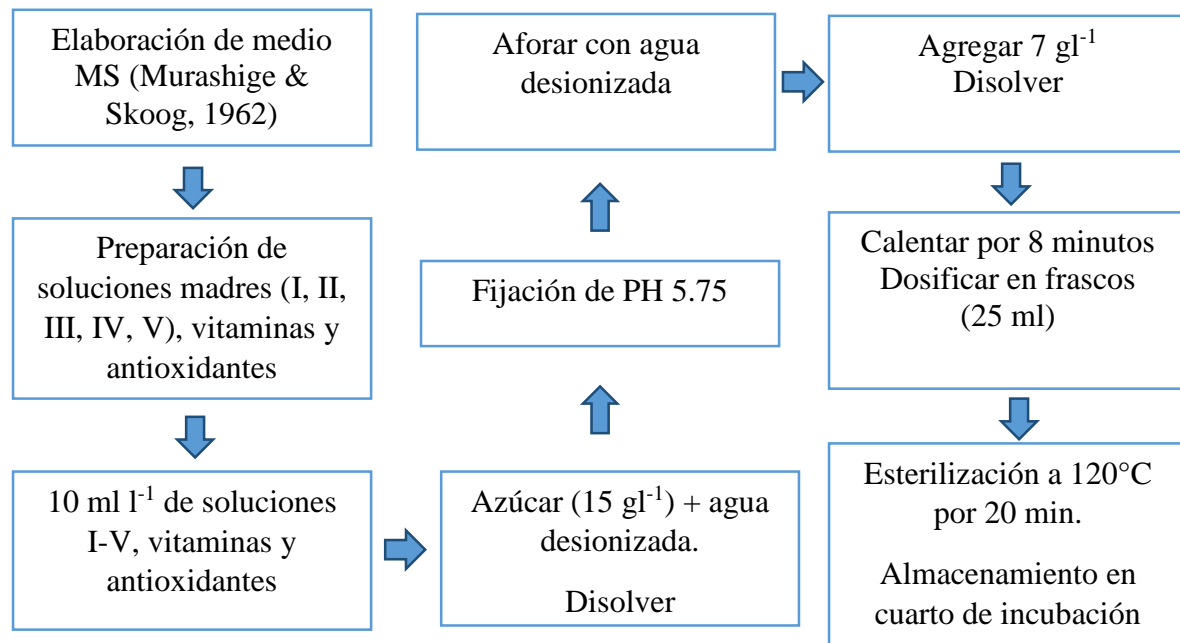
Para la propagación de las dos especies, se utilizó el medio de cultivo MS adicionado con tres reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones, en los cuales se colocaron hipocótilos y cotiledones provenientes de plántulas germinadas *in vitro*, a continuación se hace la descripción de estos experimentos:

##### **7.4.1. Medio de cultivo utilizado para la obtención de plántulas**

El medio de cultivo que se utilizó para la germinación de las semillas de las especies fue MS, el cual fue enriquecido con vitaminas ( $10\text{ ml l}^{-1}$ ), antioxidantes ( $10\text{ ml L}^{-1}$ ) y azúcar ( $15\text{ gl}^{-1}$ ), el pH se ajustó a 5.75 con HCl 1N y NaOH 1N, como agente gelificante se utilizó Agar® (Agar-Agar) ( $7\text{ gl}^{-1}$ ).

En la Figura 10 se muestra, el diagrama de procedimiento que se llevó a cabo para la elaboración del medio de cultivo, los cuales fueron al final colocados en frascos de vidrio

tipo gerber, sellados con papel aluminio, concluyendo el proceso con la esterilización en autoclave a 120°C y 1.5 psi durante 20 minutos (Figura 11).



**Figura 10.** Esquema de la elaboración del medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962).



**Figura 11.** Equipo utilizado para la elaboración de medio de cultivo. a) Balanza analítica, b) Potenciómetro, c) Autoclave, d) medios de cultivo.

Después de la siembra, se transfirieron al cuarto de incubación bajo condiciones controladas, con un fotoperiodo de 16-8 horas luz/oscuridad, una intensidad luminosa de  $140\mu\text{M m s}^{-1}$ , una temperatura de  $25\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ , y humedad relativa del 40%.

#### 7.4.2. Inducción a Organogénesis de *Trema micranthum* y *Heliocarpus appendiculatus*

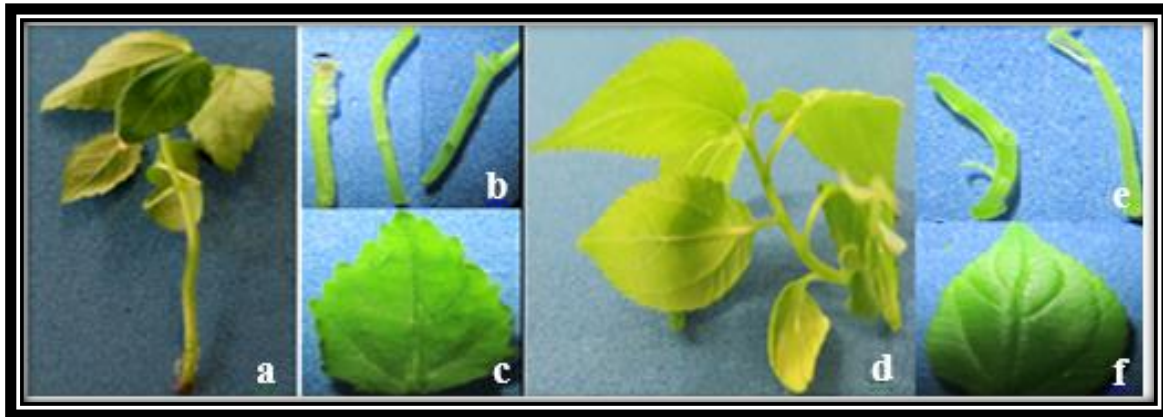
Para la inducción de brotes adventicios de *Trema micranthum* y *Heliocarpus appendiculatus* se utilizó el medio MS, al cual fue enriquecido con tres reguladores de crecimiento: BAP, Kinetina y Espermidina a tres concentraciones diferentes (Tabla 4), cada uno de ellos contando con tres repeticiones.

Para este experimento se tomaron como explantes los hipocótilos y hojas cotiledonares obtenidos de las plántulas germinadas *in vitro*, las cuales fueron disectadas en 3 partes cada una (Figura 12) dentro de la campana de flujo laminar bajo condiciones totalmente asépticas con el objetivo de evitar la contaminación por hongos y bacterias que se encuentran en el ambiente.

**Tabla 4.** Tratamientos para la inducción de brotes de *Trema micranthum* y *Heliocarpus appendiculatus*.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento	[mg l <sup>-1</sup> ]
1	BAP	0.5
2		1
3		3
4	Kinetina	0.5
5		1
6		3
7	Espermidina	0.5
8		1
9		3





**Figura 12.** Plántulas y explantes utilizados para la inducción de brotes. **a)** Plántula de *H. appendiculatuz*, **b)** Hipocótilos de *H. appendiculatuz*, **c)** Hojas de *H. appendiculatuz*. **d)** Plántula de *T. micrantum*. **e)** Hipocótilos de *T. micrantum*, **f)** Hojas de *T. micrantum*.

Finalizada la siembra, se colocaron en el cuarto de incubación bajo condiciones controladas, con un fotoperiodo de 16 -8h luz/oscuridad, intensidad luminosa de  $140\mu\text{M m s}^{-1}$  con una temperatura de  $25\pm 2$  °C, y humedad relativa del 40%, para después evaluar los resultados de formación de brotes por explantes.

Cabe mencionar que estos registros se siguieron cada tercer día durante un ciclo de cultivo (30 d).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSION

El proceso de germinación está influenciado por diversos factores internos y externos. Dentro de los factores internos se encuentran la viabilidad del embrión, cantidad y calidad del tejido y los diferentes tipos de dormancia que pueden presentar. Alguno de los factores externos que retardan el proceso de la germinación son el grosor de la testa, disponibilidad de agua, temperatura, etc.

Los resultados que se obtuvieron en los experimentos realizados en este trabajo se dividieron en dos partes:

- a) Imbibición de semillas, tinción con tetrazolio y evaluación de GA<sub>3</sub> y KNO<sub>3</sub> como promotores de la germinación en semillas *Trema micranthum*.
- b) Cultivo *in vitro* de *Trema micranthum* y *Heliocarpus appendiculatus*.

### 8.1. Rompimiento de latencia en semillas de *Trema micranthum*

#### 8.1.1. Imbibición de las semillas

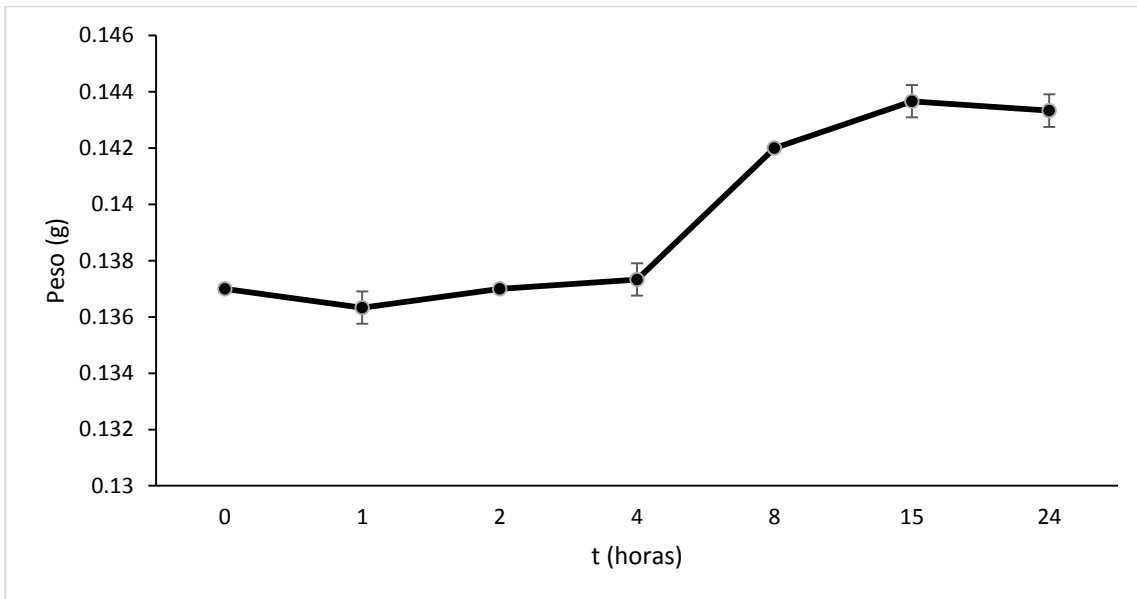
Las pruebas de imbibición tuvieron como finalidad determinar la permeabilidad de las semillas al agua (Baskin, 2001), para determinar la rapidez de absorción de agua y poder establecer el tiempo necesario para impregnar las semillas con los promotores de la germinación y el tetrazolio.

La (Figura 13) muestra el comportamiento típico durante la etapa I de imbibición de las semillas. Durante las primeras tres horas de imbibición, las semillas presentan un incremento significativo de peso, lo que demuestra una cierta rigidez de la testa. Sin embargo, después de cinco horas se presenta una rápida absorción de agua, y esta se estabiliza después de las quince horas de exposición.

Los resultados demuestran que las semillas de *T. micranthum* presentan una rápida absorción de agua, alcanzando un incremento en peso aproximado de 0.043 g, lo

anterior indica un tipo de latencia endógena, no siendo la testa una barrera para el restablecimiento del metabolismo de la semilla (Bewley, 1994).

Con base en los resultados obtenidos se determinó que para evaluar el efecto de los promotores de germinación y la viabilidad, 24 horas son suficientes para lograr una máxima imbibición.



**Figura 13.** Ganancia de peso (g) en semillas de *Trema Micranthum* durante la imbibición.

### 8.1.2. Tinción con tetrazolio en semillas de *Trema micranthum*

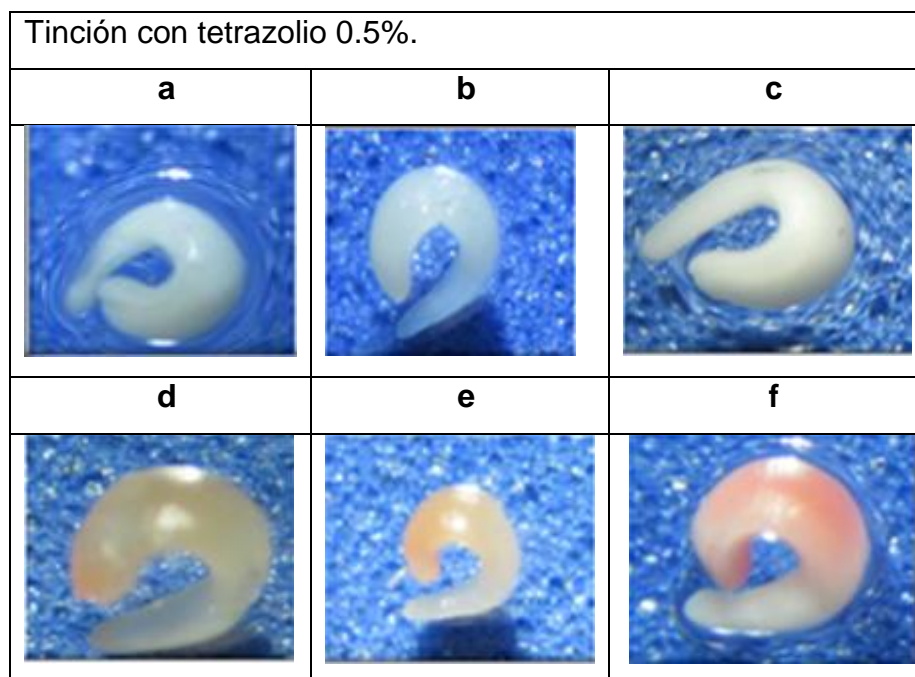
La prueba de tetrazolio fue utilizado para categorizar la viabilidad de los embriones. En los embriones, el tetrazolio diferencia los tejidos vivos de los muertos en base a la actividad de enzimas de la respiración (deshidrogenasas). Al ser hidratadas las semillas, la actividad de las deshidrogenasas incrementa, resultando en la liberación de iones hidrógeno, lo que reduce a la solución de tetrazolio a formazán (color rojo). El formazán tiñe a las células vivas de color rojo, en tanto que las muertas permanecen sin colorear. La viabilidad de las semillas se determinó en función del patrón de tinción del embrión y la intensidad de la coloración.

La Figura 14, muestra los resultados obtenidos en una solución al 0.5% p/p de tetrazolio. Como puede observarse de manera general, el grado de tinción fue dependiente del tiempo de inmersión.

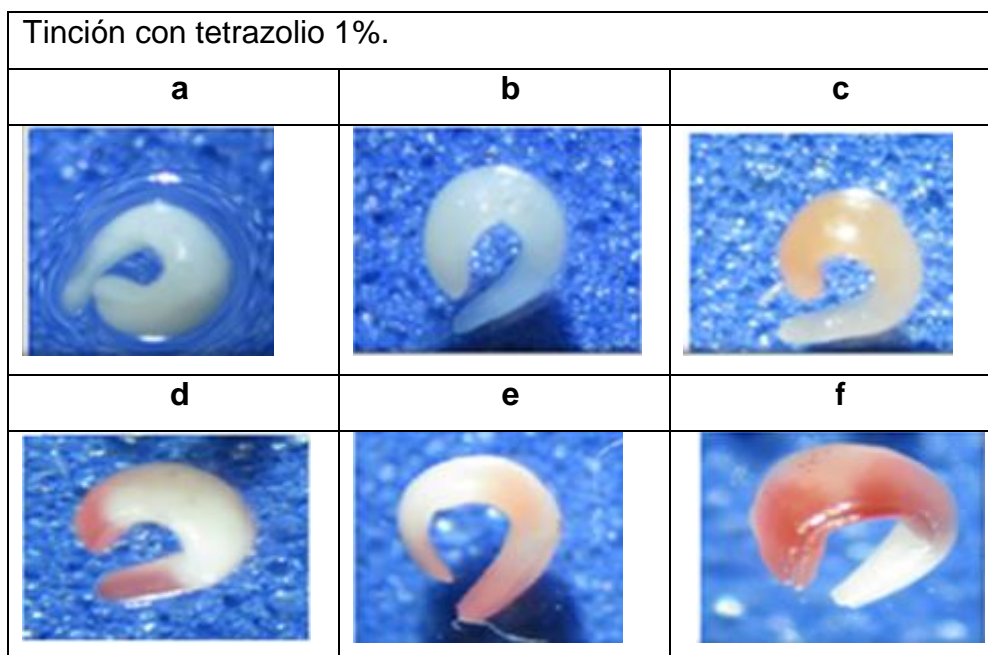
Durante las primera 3 horas de exposición los embriones no presentaron coloración alguna (Figura 14(b-c), sin embargo, a partir de 6 horas (Figura 14(d)) los embriones de las semillas de *Trema micranthum* comenzaron a presentar una tonalidad rojiza, alcanzando una mayor tinción a las 24 horas.

A diferencia de ello, en la Figura 15(e-f) se observa que cuando las semillas estuvieron bajo la concentración al 1% de tetrazolio ya presentaban coloración rosa claro a partir de las tres horas de exposición de las semillas (Figura 15(c)) y conforme transcurrieron las horas se tornaron a color rojo más fuerte.

Sin embargo, la tinción con tetrazolio no se determina si una semilla germinará, debido a que las semillas a partir de la tinción de los tejidos de los embriones pueden categorizarse como viables, viables germinables y no viables (Borza *et al.*, 2007).



**Figura 14.** Tinción con tetrazolio al 0.5% con embriones de *Trema micranthum* a diferentes tiempos de exposición: a) Testigo b) 1 hora; c) 3 horas; d) 6 horas; e) 12 horas; f) 24 horas.



**Figura 15.** Tinción con tetrazolio a diferentes tiempos de exposición: a) Testigo b) 1 hora; c) 3 horas; d) 6 horas; e) 12 horas; f) 24 horas.

Con los resultados obtenidos se pudo observar que a mayor concentración mayor tinción en los embriones en menor tiempo de exposición.

Resultados similares fueron reportados por Hernández, M. I. *et al.* (2009) para *Vaccinium meridionale* Swartz, donde obtuvieron una mejor tinción con la dosis de 1% de tetrazolio en comparación con la de 0,5%, con resultados más evidentes con imbibición en el químico, al 1%, durante 3 h en condiciones de temperatura ambiente. La prueba de tetrazolio es un método reconocido para el análisis de viabilidad de las semillas (Nurse *et al.*, 2005).

### 8.1.3. Pruebas de Germinación

La germinación de las semillas de *Trema micranthum* de manera *ex vitro* es tardía, tiende a germinar después de los 60 días de la siembra, sin embargo, de manera *in vitro* se observó que la germinación se presentó a partir del día 27 de siembra.

En la Figura 16 se puede observar que el porcentaje de germinación más alto en las semillas de *Trema micranthum* se presentó al ser expuestas en el Ácido Giberélico, debido a que se alcanzó una germinación mayor al 30% a una concentración de 500 mgL<sup>-1</sup> a partir del día 27; seguida a ella se obtuvo un 24% de germinación con 1000 mgL<sup>-1</sup> de Ácido Giberélico y por último un máximo del 10% en concentración de 2000 mgL<sup>-1</sup>.

A diferencia de los resultados con Ácido Giberélico, se mostró menor porcentaje de germinación con el Nitrato de Potasio (Figura 17) ya que la germinación comenzó a partir del día 36 con un 5% aproximadamente con 500 mgL<sup>-1</sup> de Nitrato de Potasio y en el día 48 se presentó una estabilización de la germinación (10%). Siendo así hasta el día 54 que se presentó un incremento en el porcentaje y estabilizándose al día 57 con un 14% de semillas germinadas.

Por otra parte, en la misma figura también se puede observar que el tratamiento con 2000 mgL<sup>-1</sup> no tuvo ningún indicio de germinación.

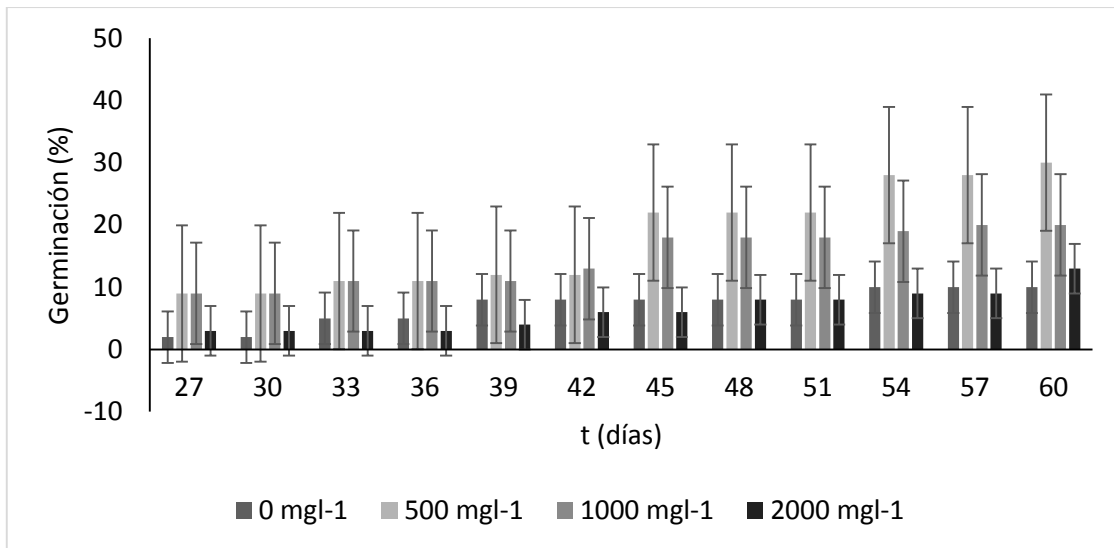
Comparando los resultados de ambos promotores de la germinación, el Ácido Giberélico obtuvo mayor porcentaje de germinación en relación a los días y el tiempo de exposición de las semillas en comparación del Nitrato de Potasio.

En investigaciones realizadas para la germinación *in vitro* de forestales, han utilizado ácido giberélico como regulador de crecimiento para embriones, ya que permite mejorar la energía germinativa de las especies, debido a que este regulador es conocido como principal hormona para inducir la germinación (Vidales, 2003).

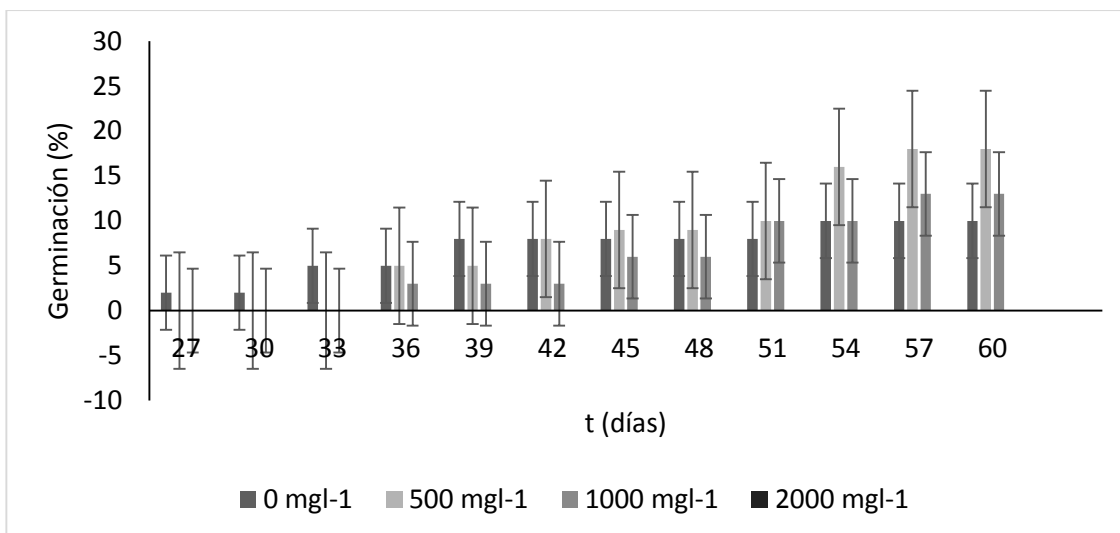
Por otro lado, los resultados que se obtuvieron pudieron ser comparados con otras especies como en las semillas de agraz, en donde de la misma manera se obtuvo un porcentaje del 32% de germinación con ácido Giberélico (Devlin *et al.*, 1977; Giba *et al.*, 1995).

De acuerdo con Santamaría *et. al.*, (2012), otra especie que tuvo un efecto positivo ante la exposición del ácido giberélico fue el *Cedrela montana*, en el cual a pesar de que no obtuvo germinación del 100%, mostró un efecto germinativo ante la presencia de este promotor (60%).

La comparación de los resultados obtenidos en este estudio contra otros de diferentes especies muestra que el efecto de los promotores de germinación como el ácido giberélico es positivo, por lo que se puede usar ante la latencia que presenten algunas semillas, sin embargo, la concentración a utilizar y el tiempo de imbibición van a depender de la especie.



**Figura 16.** Ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en el porcentaje de germinación de *Trema micranthum* después de 27 y hasta 60 días.



**Figura 17.** Nitrato de Potasio (KNO<sub>3</sub>) en el porcentaje de germinación de *Trema micranthum*.

En la figura 18, se incluye la categorización de la viabilidad (germinación y latencia) y de la no viabilidad (ausencia de tinción con tetrazolio) obtenida en las semillas de *Trema micranthum*. El porcentaje de germinación, porcentaje de semillas viables germinables y el porcentaje de semillas no viables se obtuvieron por las siguientes expresiones:

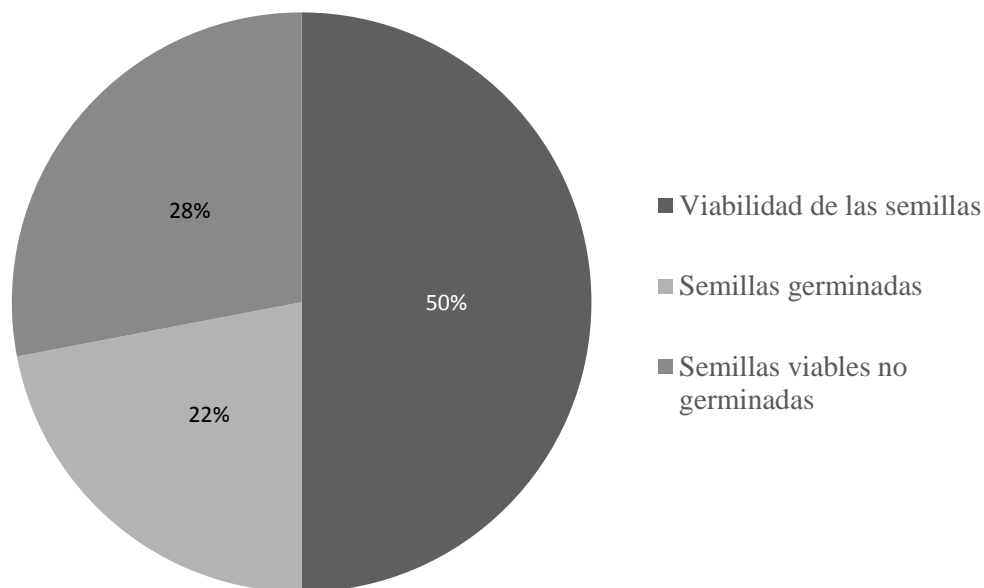
$$\% \text{ de semillas viables germinables} = \left( \frac{\text{Número de semillas germinadas}}{\text{Semillas totales}} \right) \times 100$$

$$\% \text{ de semillas viables} = \left( \frac{\text{Número de semillas teñidas}}{\text{Semillas totales}} \right) \times 100$$

$$\% \text{ de semillas no viables} = \left( \frac{\text{Número de semillas no teñidas}}{\text{Semillas totales}} \right) \times 100$$

Las semillas de *Trema micranthum* tuvieron un 80% de viabilidad, 35% de semillas germinadas y 45% de semillas viables no germinadas, por último, se obtuvo el 20% de semillas no viables con las pruebas en el test de tetrazolio.





**Figura 18.** Categorización de la viabilidad (germinación y latencia) y de la no viabilidad (ausencia de tinción con tetrazolio).

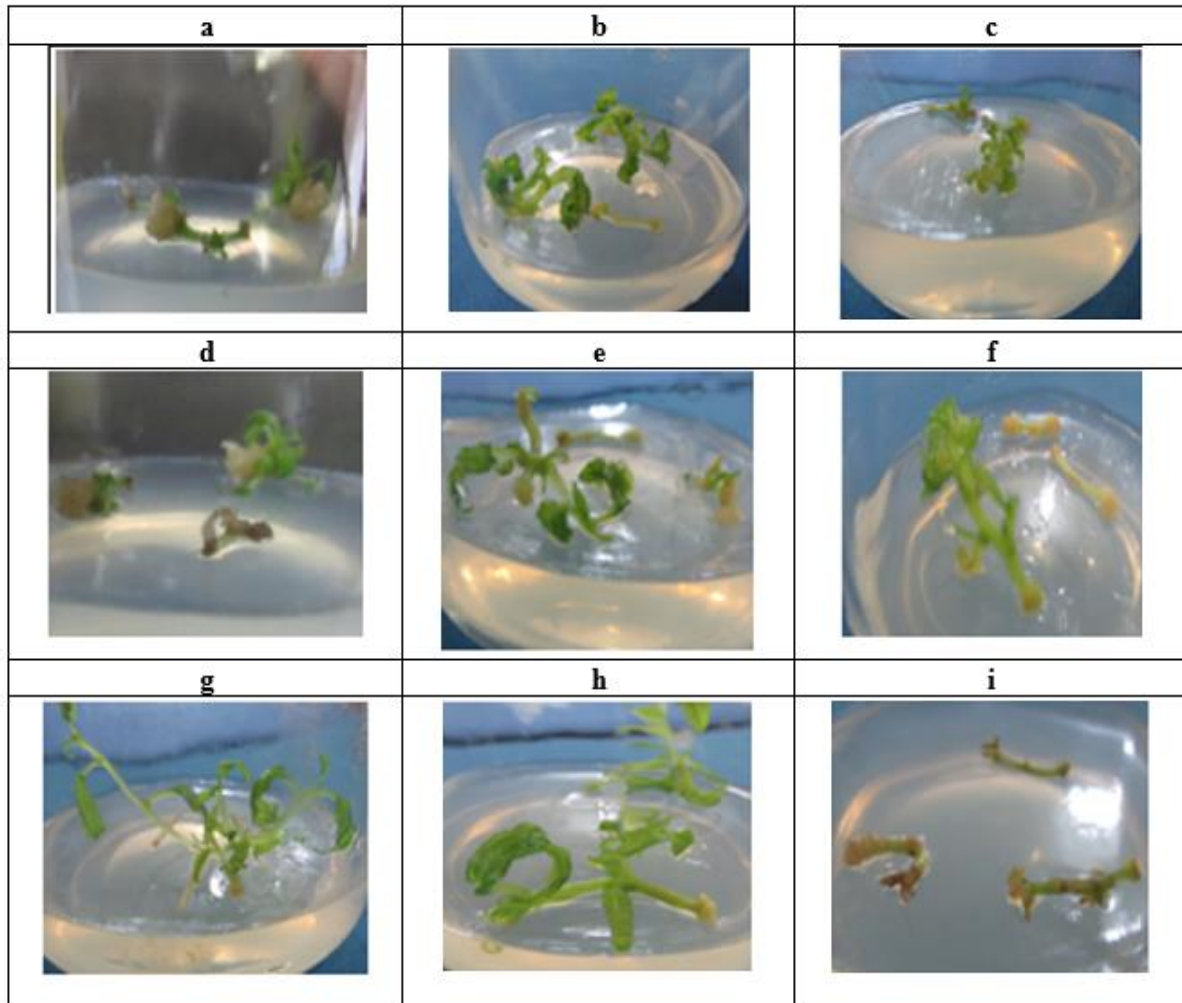
## 8.2. Inducción a Organogénesis de *Trema micranthum*

Con una concentración de 3 mg $l^{-1}$  de BAP se obtuvo un porcentaje menor al 10% en la inducción de brotes (Figura 19 a) y mayor inducción de masas callosas (80%). Por otro lado, con una concentración de 1 mg $l^{-1}$  de BAP se obtuvo una mejor respuesta en relación al número de brotes en los explantes (24%) (Figura 19 b), seguido a ello a concentraciones de 0.5 mg $l^{-1}$  de BAP existió un porcentaje menor al 20% de inducción de brotes.

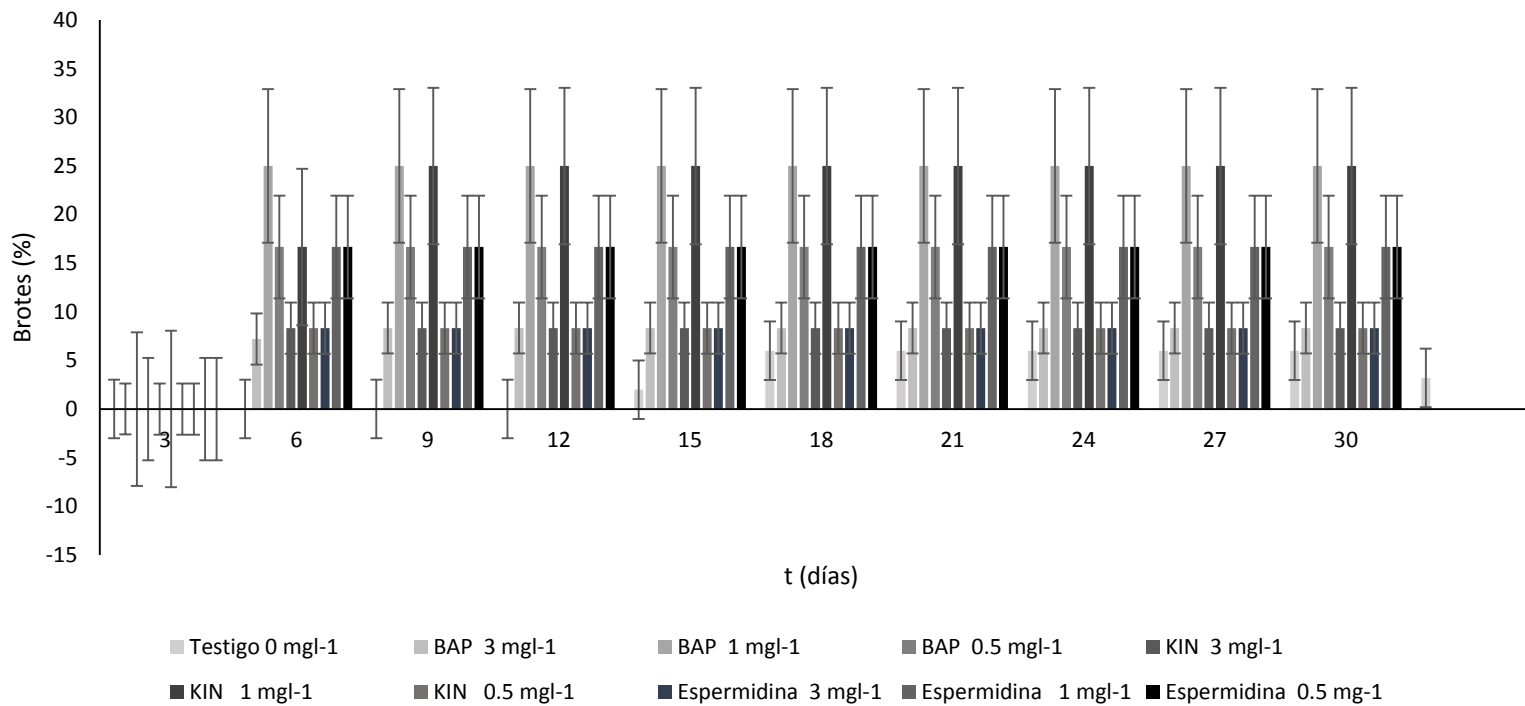
Sin embargo, se demuestra que *Trema micranthum* tiende a obtener mayor porcentaje de brotes cuando se disminuyeron las concentraciones (1 y 0.5 mg $l^{-1}$ ).

Otro de los tratamientos que obtuvo alto porcentaje de brotes fue al utilizar 1 mg $l^{-1}$  de Kinetina, en donde al igual que con la hormona BAP se tuvo un mayor número de brotes, el cual superó 15% (Figura 19 e), a diferencia de esto, cuando se utilizaron concentraciones de 3 y 0.5 mg $l^{-1}$  de Kinetina se tuvo un porcentaje menor de brotes (10%) (Figuras 19 d, f); se apreció que hubo presencia de masas callosas.

Por otro lado con la hormona Espermidina a las tres concentraciones utilizadas 3,1, 0.5  $\text{mgL}^{-1}$  Espermidina no hubo altos porcentajes de inducción de brotes, las tres concentraciones utilizadas estuvieron por debajo del 10% de brotes obtenidos (Figuras 19 g, h, i). Haciendo una comparación entre los tres reguladores de crecimiento que se utilizaron Espermidina no mostró un porcentaje alto de brotes a comparación de los reguladores de crecimiento BAP y Kinetina como se puede observar en la figura 20.



**Figura 19.** Brotes de *Trema micranthum*. a) Brotes y masas callosas obtenidas con 3  $\text{mgL}^{-1}$  BAP, b) Organogénesis en exposición con 1  $\text{mgL}^{-1}$  BAP, c) Brotes y masas callosas en 0.5  $\text{mgL}^{-1}$  BAP, d) Organogénesis obtenida en 3  $\text{mgL}^{-1}$  Kinetina, e) Organogénesis en 1  $\text{mgL}^{-1}$  Kinetina, f) Obtención de brotes con 0.5  $\text{mgL}^{-1}$  Kinetina, g, h) 3  $\text{mgL}^{-1}$  y 1  $\text{mgL}^{-1}$  Espermidina presentaron solo inducción de órganos, i) Masas callosas obtenidas con 0.5  $\text{mgL}^{-1}$  Espermidina.



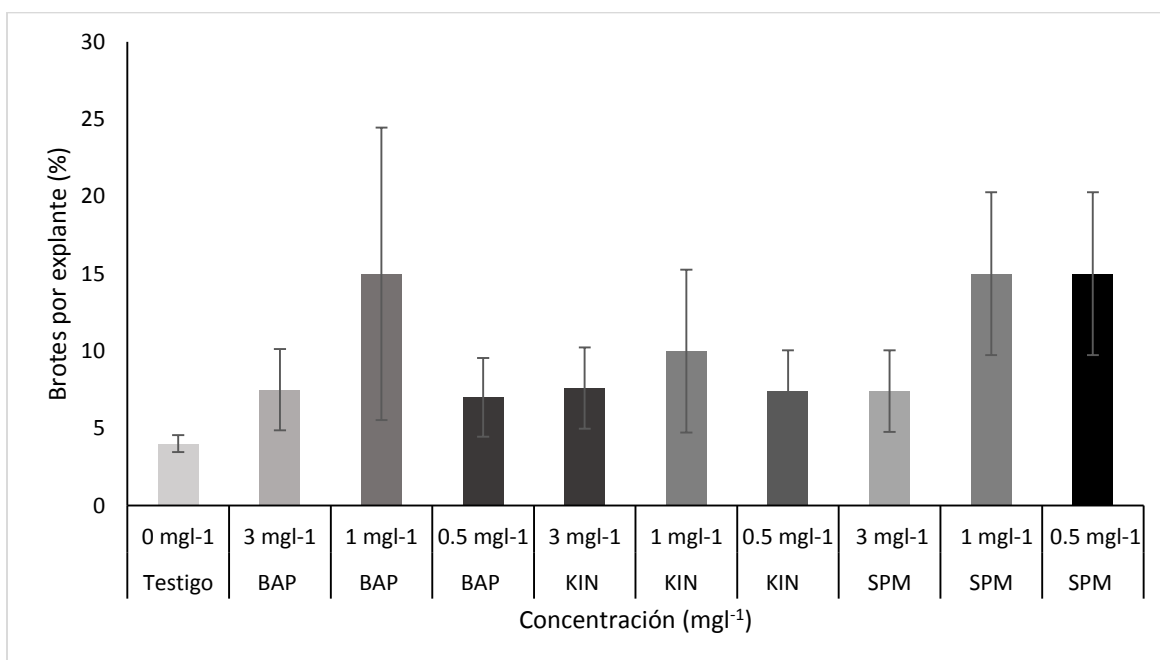
**Figura 20.** Brotos de *Trema micranthum* obtenidos en los diferentes reguladores de crecimiento con las diferentes concentraciones utilizadas después de tres días de exposición en cada regulador de crecimiento.

Los resultados graficados se obtuvieron con el promedio general de las repeticiones.

De acuerdo a lo planteado se puede observar que no existe diferencia estadística significativa entre cada uno de los tratamientos  $^{ns}p>0.05$ .

Espermidina fue el regulador de crecimiento que presentó mayor porcentaje de inducción de brotes por explante, teniendo como resultado que a 1 y 0.5 mgL<sup>-1</sup> de Espermidina se tuvieron 3 brotes por explante, al igual que ello, se presentó el mismo resultado al contabilizar con 1 mgL<sup>-1</sup> de BAP (Figura 21).

Sin embargo, a diferencia de otras especies como el cedro rojo, *Trema micranthum* presentó la inducción de brotes a partir del sexto día de la siembra.



**Figura 21.** Porcentaje de brotes por explante de *Trema micranthum*

Estos resultados difieren con los obtenidos por Sammantaray (1994), ya que realizó inducción organogénica en *Trema orientalis* y obtuvo mayor porcentaje de inducción de masas callosas que brotes cuando los explantes fueron expuestos en un medio de cultivo enriquecido con la combinación de BAP, NAA.

A diferencia de ello, *Trema micrantha* presentó un porcentaje mayor en inducción de brotes, sin embargo se obtuvieron alrededor del 20% de masas callosas con los reguladores de crecimiento BAP y Kinetina a 3 mgL<sup>-1</sup> y posteriormente se obtuvo la organogénesis.

### 8.3. Inducción a Organogénesis de *Heliocarpus appendiculatus*

El efecto del BAP presentó un bajo porcentaje de inducción de brotes en las concentraciones de 3 y 1 mgL<sup>-1</sup> (Figura 22 a, b), a concentraciones de 0.5 mgL<sup>-1</sup> no hubo presencia de brotes y se obtuvo el 100% de inducción de callos a partir del séptimo día de la siembra (Figura 22 c). Esto puede deberse a que la especie presenta altas concentraciones de auxinas de forma natural.

Los explantes que se sembraron en las tres concentraciones de Kinetina, tuvieron como resultado mayor del 10% de brotes adventicios de *Heliocarpus appendiculatus*.

A concentraciones de 3 y 1 mgL<sup>-1</sup> se tuvo igualdad de inducción de brotes (Figura 22 d, e), a diferencia de ello, al observar los explantes que se colocaron con 0.5 mgL<sup>-1</sup> de Kinetina tuvieron menor porcentaje de inducción (Figura 22 f).

Espermidina tuvo mayores resultados al aplicar 1 mgL<sup>-1</sup> sobre los explantes (Figura 22 h) a diferencia de las concentraciones de 3 y 0.5 mgL<sup>-1</sup> (Figura 22 g, i).

La comparación de los resultados obtenidos (Figura 23) con los tres reguladores de crecimiento aplicados a los explantes de *Heliocarpus appendiculatus* bajo tres concentraciones diferentes, en donde se aprecia que al aplicar BAP 3 mgL<sup>-1</sup> se obtuvo un porcentaje de 12.77% de inducción de brotes, los cuales comenzaron con su desarrollo a partir del sexto día de la siembra, diferido a esto 1 mgL<sup>-1</sup> de BAP solo obtuvo un 5% de brotes y 0.5 mgL<sup>-1</sup> no tuvo inducción de brotes.

Después del sexto día de siembra, los explantes que se encontraban con Kinetina con 3 y 1 mgL<sup>-1</sup> tuvieron un porcentaje de inducción del 15% y un 9% a 0.5 mgL<sup>-1</sup> manteniendo el mismo número de explantes con brotes durante los 30 días de siembra.

Estos mismos resultados se obtuvieron con Espermidina a  $1 \text{ mg l}^{-1}$  en el cual tuvo el mismo porcentaje que los explantes anteriores.

Comparando el efecto de los tres reguladores de crecimiento, se puede observar que para esta especie al aplicar concentraciones de 3 y  $1 \text{ mg l}^{-1}$  se obtiene un porcentaje no mayor al 15% de brotes.

En otras especies que se ha llevado a cabo la inducción organogénica no se han observado los mismos resultados, esto se debe a que son diferentes especies, en donde:

Álvarez (2004) menciona que en *G. arbórea* los mejores resultados, en porcentaje de brotes se presentaron cuando los explantes se cultivaron con  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP (25%); se evidenció que al aumentar las dosis de BAP ( $1$  y  $3 \text{ mg l}^{-1}$ ) en ambos medios de cultivo se produjeron fenómenos de hiperhidratación y callogenesis a partir de la segunda semana de cultivo y concluyó que la concentración adecuada de citoquinina para inducir organogénesis, debe ser inferior a  $1.0 \text{ mg/L}$ .

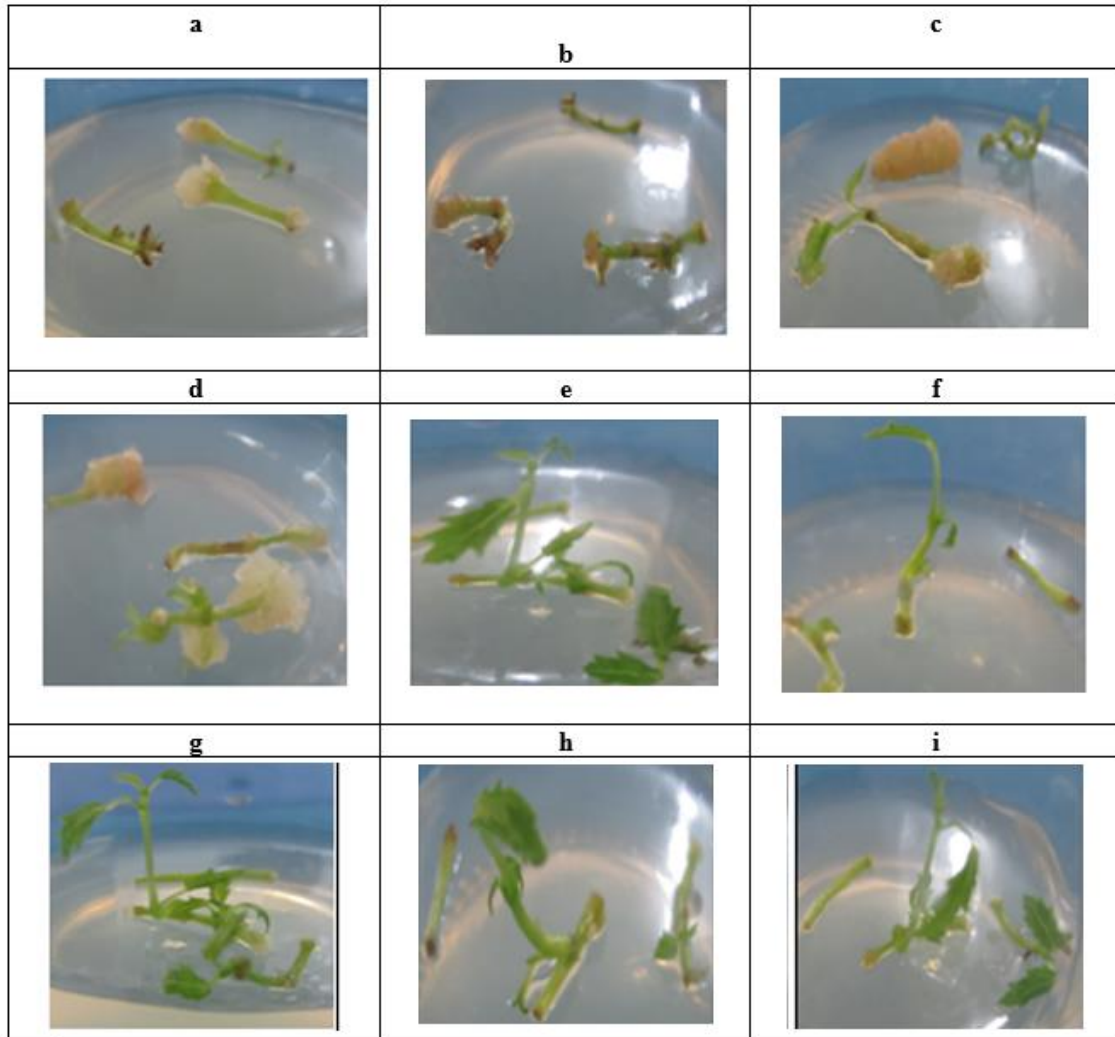
Valverde, 2002 encontró que en *Dalbergia retusa* existía una tendencia a disminuir el número de brotes con aumentos en las concentraciones de la benciladenina, no obstante el análisis de los datos no reveló diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ). El valor más alto (78 brotes) se observó a una concentración de  $4.4 \mu\text{M}$  y el menor valor (50 brotes) a una concentración de  $22.2 \mu\text{M}$ . El promedio de brotes por explante fue muy similar en todas las concentraciones y tampoco se halló diferencia significativa entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ).

De acuerdo a lo reportado por Otahola (2000) en Parchita, observó la formación de numerosos brotes en cada explante, en los cuales en el análisis de datos mostró diferencias significativas estadísticamente del 5%, en donde el mayor número de brotes obtenidos se presentó cuando los explantes fueron expuestos con BAP  $0.6 \text{ mg l}^{-1}$ , sin embargo, existió mayor efecto inductivo cuando los explantes se expusieron en  $1.2 \text{ mg l}^{-1}$  de este mismo regulador.

Similarmente, Dornelas *et, al.*, (1994) quien trabajó con diferentes especies de *Pasiflora*, encontraron que el mayor porcentaje de obtención de brotes resultó al exponer los explantes en BAP  $1 \text{ mg l}^{-1}$ .

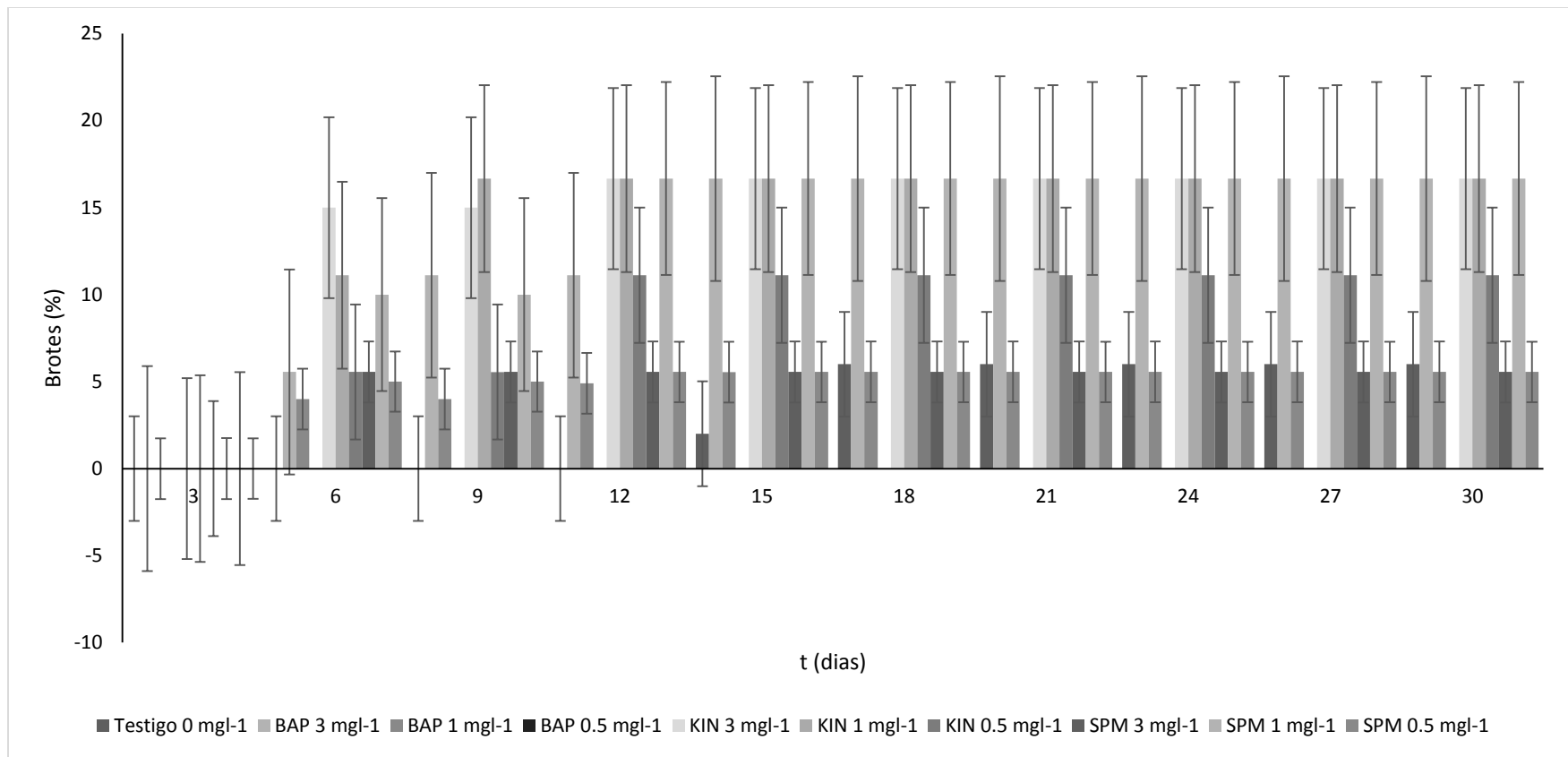
Estos resultados obtenidos en este trabajo son similares a los dos expuestos anteriormente en donde se demuestra que al utilizar BAP a concentraciones de 1 y  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  hay una inducción de brotes.

Finalmente, el cultivo de tejidos vegetales como parte de la biotecnología cada día es más necesaria y útil en la recolección, intercambio y preservación de especies forestales amenazadas, en peligro de extinción o con un gran valor económico a nivel industrial, debido a que mundialmente se ha incrementado la demanda de productos forestales.



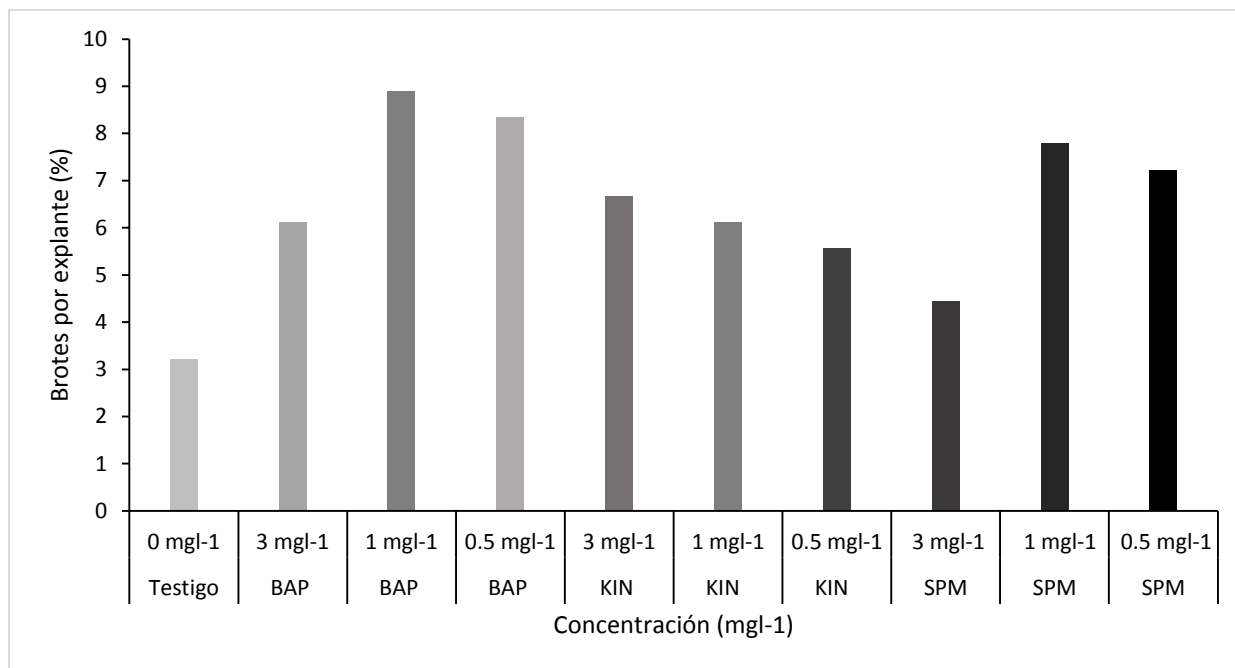
**Figura 22.** Inducción de brotes de *H. appendiculatus*. a) 3 mg l<sup>-1</sup> BAP, b) 1 mg l<sup>-1</sup> BAP, c) 0.5 mg l<sup>-1</sup> BAP; d) Obtención de callos con 3 mg l<sup>-1</sup>, e) Obtención de brotes con 1 mg l<sup>-1</sup> Kinetina, f) 0.5 mg l<sup>-1</sup> Kinetina, g) 3 mg l<sup>-1</sup> Espermidina, h) 1 mg l<sup>-1</sup> Espermidina, i) 0.5 mg l<sup>-1</sup> Espermidina.





**Figura 23.** Porcentaje de brotes de *Heliocarpus appendiculatus* obtenido del día seis hasta el día treinta.

El mayor porcentaje de brotes que se obtuvo fue con BAP a 1 y 0.5 mg l<sup>-1</sup> con un 8% aproximadamente de brotes por explante, seguido a ello, Espermidina obtuvo un porcentaje mayor al 7%, por otra parte, Kinetina presentó resultados menores al 7% (Figura 24).



**Figura 24.** Brotes por explante de *Heliocarpus appendiculatus* obtenidos en la exposición de hipocótilos en los reguladores de crecimiento con las tres concentraciones utilizadas después de treinta días de exposición.

## 9. CONCLUSIONES

Al realizar las pruebas con el test de tetrazolio se observó que las semillas de *Trema micranthum* tienen un porcentaje del 50% de viabilidad.

Los protocolos que fueron utilizados para la germinación, demostraron que las semillas de *Trema micranthum* presentan latencia de tipo endógena, la cual, se puede inhibir con promotores de germinación como el GA<sub>3</sub> [500 mgL<sup>-1</sup>], el cual acelera el proceso de germinación en base al tiempo a partir del día 36 (10%); sin embargo, no supera la tasa de germinación en condiciones naturales (mayor al 60%).

Por otro lado, KNO<sub>3</sub> no tuvo el mismo resultado en las semillas de esta especie, ya que la germinación comenzó a partir del día 40 con un porcentaje no mayor al 5%.

Las semillas de *Heliocarpus appendiculatus* no muestra ningún tipo de latencia, por lo que fue posible su germinación rápida por medio de la técnica de propagación del cultivo *in vitro*.

Un sistema de propagación vía organogénica a partir de fragmentos de hipocótilos fue desarrollado. La inducción de brotes adventicios en *Trema micranthum* cultivados en medio MS mostró que al agregarse BAP a concentraciones de 0.5 y 1 mgL<sup>-1</sup> obtuvo un porcentaje mayor al 23% de brotes, difiriendo así con 3 mgL<sup>-1</sup> que presentó inducción menor al 10%.

*Heliocarpus appendiculatus* no presentó respuesta positiva en base a inducción de brotes cuando se evaluó el efecto del BAP a diferentes concentraciones, ya que se obtuvo un porcentaje mayor al 90% de callos. Diferido a ello, al evaluar el efecto de Kinetina se observó que hubo un porcentaje mayor del 10% de inducción de brotes a concentraciones de 0.5 y 1 mgL<sup>-1</sup>

Estos resultados demuestran que depende de la especie y la concentración de los reguladores de crecimiento en la inducción de brotes.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Ackerly, D.; González, R. y Dirzo. 1997. *Trema micrantha (capulín)*. Historia natural de los Tuxtlas. UNAM, Instituto de Biología. México.
- Alvarez, M; Beltran P. y Mesa L. 2004. Evaluacion de reguladores de crecimiento vegetal en la organogenesis de *Gmelina arborea roxb*. Laboratorio de Protección de Plantas y Cultivo *in vitro* Universidad del Tolima, Grupo GEBIUT. A. A. Revista Tumbaga 2011-6-107-124-546.
- Álvarez, A.; Williams. L. 2005. "Disturbance effects on the seed bank of Mexican cloud forest fragments1. *Biotropica* 37(3):337-342 p.
- Azcón, B. and Talón, M. 1993. *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Interamericana- McGraw-Hill. Madrid. 581 p.
- Barrón, O. 2007. La fabricación de papel amate por los indígenas otomíes: Un vehículo de contenido religioso y cultural. Departamento de pintura de la facultad de bellas artes. Sevilla, Universidad de Sevilla. 209 p.
- Baskin, J. and Baskin, C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14:1–16.
- Baskin, C.C. and Baskin, J.M. 1998. *Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, London. 666 p.
- Bewley, J. and Black, M. 1994. *Seeds: physiology of development and germination*. Plenum Press. New York. 445 p.
- Bewley, J. D. y M. Black. 1994. *Seeds physiology of development and germination*. 2<sup>nd</sup> ed. Plenum press, New York. 445 p.
- Borza, J.; Westerman y M. Liebman. 2007. Comparing estimates of seed viability in three foxtail (*Setaria*) species using the imbibed seed crush test with and without additional tetrazolium testing. *Weed Technol.* 21:518-522 p.
- Calva, C.; Esparza G.; Pérez v. J., Martínez V. M.; Silva S.; Sánchez I. 2002. Plantas como biorreactores para la producción de biomoléculas y remoción de xenobióticos. *Avance y Perspectiva* 21:307-312.
- Linneo, C., 1753. *Heliocarpus americanus* L. *Species Plantarum* 1:448

- Chawla, H. 2004. Introduction to plant biotechnology. Second edition. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA, India. 538 p.
- CONABIO. 2009. Catálogo taxonómico de especies de México. 1. In Capital Nat. México. CONABIO, Mexico City.
- Copeland, L. y Donald. M 2004. Principles of seed science and technology. 4th edition. Kluwer Academic Publishers. P. 467
- Cruz, M.; López B.; Negreros. 2011. Una especie multiusos del trópico mexicano *Trema micrantha* (L.) Blume Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México Distrito Federal, México núm. 101, p. 16-22.
- Debergh, P. 1993. Micropropagation. En: Debergh and Zimmerman, R. H. Micropropagation, technology and application. Micropropagation. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands 1-13 p.
- Devlin, R.M. y S.J. Karczmarczyk. 1977. Influence of light and growth regulators on cranberry seed dormancy. J. Hort. Sci. 52: 283-288.
- Dornelas. M.; Carneiro, 1994. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. Plant cell, tissue and organ culture 36:211-217.
- Down, J. 1982. Las Figuras de papel y el concepto del alma entre los otomíes de la Sierra. América Indígena, 42:220–226.
- Fenner, M. and Thompson, K. 2006. The ecology of seeds. Cambridge, UK: Cambridge University Press. Fennimore SA, Foley ME. 1998. Genetic and physiological evidence for the role of gibberellic acid in the germination of dormant *Avena fatua* seeds. Journal of Experimental Botany 49:89–94.
- Figueroa J., Vázquez Y. 2002. Efecto de la calidad de la luz sobre la germinación de semillas en el árbol pionero tropical *Heliocarpus appendiculatus* (Tiliaceae). Centro de Ecología, UNAM, Ciudad Universitaria, México, D. F. Rev. Biol. Trop. 50(1):31-36.
- Finch, S. y Leubner-Metzger, G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist 171:501–523.

- Gaba, V. 2005. Plant growth regulator in plant tissue culture and development. En trigano, R. N. y Gray, D. J. (eds). Plant development and biotechnology. CRC. Press. Florida. 87-89 p.
- García, M. 2000. Propagación clonal *in vitro* del Eucalipto Saligna. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Forestales. Ministerio de Educación Superior. Pinar del Río. Cuba.
- Giba, Z.; D. Grubisic y R. Konjevic, 1995. The involvement of phytochrome in light-induced germination of blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) seeds. Seed Sci. Technol. 23:11-19.
- Hatchondo, R. 1987. Estudio y conservación de las fibras de corteza empleadas en la Sierra Norte de Puebla para la manufactura de objetos de cestería. Tesis de licenciatura en conservación y restauración de bienes muebles. INAH. México, D.F. 154p.
- Hernández, P. 2009. Comportamiento de la germinación y categorización de la latencia en semillas de mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). Agronomía Colombiana 27(1):15-23 p.
- Herrera, J.; Alizaga, R.; Guevara E.; Jimenez, V. 2006. Germinación y crecimiento de la planta: fisiología de la producción de cultivos tropicales. Editor científico Victor Villalobos. Editorial Universidad de Costa Rica, Costa Rica, 108 p.
- Hurtado, D.; Merino M. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas. México. 229 pp.
- Jacobsen, J. y Pressman E. 1979. A structural study of germination in celery (*Apium graveolens* L.) seed with emphasis on endosperm breakdown. Planta 144:241–248.
- Lay, K. 1949. A revisión of the genus *Heliocarpus* L. Annals of the Missouri Botanical Garden. 36 (4):507-541.
- López, C. 2004. “Amate’ papel de corteza mexicano (*Trema micrantha*(L.) Blume): Estrategias de extracción de corteza para enfrentar la demanda”, en M. Alexiades y P. Shanley (eds.), Conservación y medios de subsistencia. Diversos casos sobre productos forestales no maderables en AméricaLatina, vol. 3, cifor-dfid-eu. Indonesia: 387-413.

- López, C.; A. Quintana.; Meeren. 2009. Papel amate. CONABIO. Biodiversitas 82:11-15.
- Ludwig-Müller J. JD Cohen. 2002. Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiologia Plantarum* 115:320–329.
- Malonek, S.; Bomke.; Bornberg-Bauer.; Mc Rojas.; Hedden, P.; Hopkins y Tudzynski. 2005. Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Phytochemistry* 66:1296-1311.
- Marentes, B. 1995. El árbol de amate y especies afines usadas en la producción de papel en San Pablito, Pahuatlan, Puebla. México, Asociación Mexicana de Arte y Cultura Popular A.C. 28 p.
- Merkle, S.; Parrott W. y Flinn B. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe, TA (Ed) *In vitro* Embryogenesis in Plant. pp. 155-203. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands
- Morales, A. 1999. Caracterización del jonote (*Heliocarpus spp*). Árbol multipropósito para el municipio del Teocelo, Veracruz. 108 p.
- Mostacedo, C., B. 1997. Dispersión y banco de semillas de *Heliocarpus appendiculatus* Turcz, una especie pionera en los bosques tropicales. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D.F. 110 p.
- Murashige, T.; y Skoog., 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum*. 15:473-497.
- Murdoch, A.; y Ellis R. 2000. Fenner, M. (ed.). Dormancy, viability and longevity. pp. 183-214. En: Fenner, M. (ed.). *Seeds: the ecology of regeneration in plants communities*. CAB Internacional.
- Nikolaeva, M.G. 2004. On criteria to use in studies of seed evolution. *Seed Science Research* 14: 315–320.
- Nomura, K. y Komamine A. 1995. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. En: Torpe TA (Ed). *In vitro* Embryogenesis in Plants, pp. 249-265. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.

- Núñez, J. y R. Dirzo. 1997. Historia Natural de las especies: *Heliocarpus appendiculatus* (jonote). In: *Historia natural de los Tuxtlas*, Dirzo y Vogt (Eds.); México, D.F. 119-122.
- Nurse, R.; y Di Tommaso. 2005. Corn competition alters germinability of velvet leaf (*Abutilon theophrasti*) seeds. *Weed Sci.* 53:479-488.
- Olmos, S.; Luciani, G.; Galdeano, E. 2004. Micropropagación. En Echenique, V: Rubistein, C y Mrginski, L. (eds). *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Instituto Nacional de Tecnología agropecuaria. Consejo Argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología. Buenos Aires, pp. 163-172.
- Otahola, V. 2000. Regeneración de plantas de parchita (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) a partir del cultivo de discos de hojas. *Bioagro* 12(3):71-74.
- Pennington, T.; Sarukhán J. 2005. Árboles Tropicales de México, manual para la identificación de las especies. Texto Científico Universitario. UNAM-FCE. México. 523 p.
- Perrin, M.; Martin D.; Demangeat G. P, Masson JE 2001. Medium-dependen tres pose of grapevine somatic embryogenic cells. *Plant Sci.* 161:107-116.
- Peters, C.; Rosenthal, J.; Urbina, T. 1987. Otomi bark paper in Mexico: commercialization of a pre-hispanic technology. *Economic botany*, 41(3):423-432.
- Pierik, R. 1990. *In vitro*. Culture of higher plants. Holland. Kluwer Academic Publisher.
- Ramírez, G.; Blas, A.; López, M.E. Peña, M.C. Barbosa, M.C. Ponce de León, G.L. 2007. Memorias del XVII Congreso Mexicano de Botánica. Zacatecas, Zac.
- Reinert, J. 1958. Untersuchungenuber die morphogenese in gewebeulturen. *Ver. Dtsch. Bot. Ges.* 71:15-24.
- Roca, W., y Mroginski, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Colombia. CIAT. Palmira. Valle.
- Roca, W.M. y L.A. Mroginski. 1993. (segunda edición). Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali, Colomba, 970 p.
- Roem Y Schult. Blume, 1856. *Museum Botanicum* 2:58p.



- Rueda, O. 2010. Crecimiento y supervivencia de *Trema micrantha* (L) Blume (*ulmaceae*) en la sierra norte de Puebla.
- Samantaray, S. 1994. Studies on the effects of mine wastes on the vegetation of the adjoining regions of Sukinda chromite mine, Ph.D thesis, Utkal University.
- Sánchez, N.; Grau M.; Manzanera J. M.; Bueno M. 1999. "RADP markers for the identification of populus species and P. tremula clones". En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed). 22-25 September, Vitoria –Gasteiz, Spain. 125-128 p.
- Sánchez, O. 2000. Micropropagación de algunas leñosas nativas. Editorial Trama. Universidad de concepción, Chile. 322 p.
- Santamaría, J.; Páez, T.; Soria. N.; Reyes. C. 2012. Establecimiento de un protocolo para la germinación *in vitro* e inducción a callo embriogénico de cecro (*Cedrela montana*) a partir de embriones cigóticos. Departamento de ciencias de la vida, Cununyacu.
- Skoog, F.; CO Miller. 1965. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In: Molecular and Cellular Aspects of Development, E. Bell ed., Harper and Row, New York, 481-494 p.
- Sousa P.; Lemos-Filho and D. M. 2006. Imbibition of *Switenia macrophylla* (Meliaceae) seeds: The role of stomata. *Annals of botany* 98(1):213-217.
- Standley, P.; y Steyermark J. 1949. Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*. 24:310-312.
- Steward, F.; Mapes M. y Mears K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. *American Journal of Botany*. 45:705-708.
- Street, H. E. 1977. Introduction. En: Street, H. E. (ed.). *Plant tissue and cell culture*. University of California, press. Berkeley, California, E.U. 1-10 p.
- Suárez, F. 2011. Micropropagación *in vitro* de piña (*Ananascomosus L. Merrii*) Híbrido MD-2, a partir de cortes de yemas laterales y apicales. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.
- Tisserat, B.; Esan E., Murashige T. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* 1:1-78.

- Torres, R. 1996. Biología da Reproducao de *Trema micrantha* (L.)Blume (Ulmaceae).PhD
- Valverde, L.; Alvarado L. 2004. Organogénesis *in vitro* en *Dalbergia retusa* (Papilionaceae). Rev. biol. trop vol. 52 no.1 San José mar.
- Vázquez, C. 1988. “*Trema micrantha* (L). Blume (Ulmaceae): A promising neotropical tree for site amelioration of deforested land”. Agroforestry systems. 40 (1):97-104 p.
- Villalobos, A.; Leung, D.W.; Thorpe, A. 1984. Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiata pine. Universidad Católica de Occidente. República de El Salvador.
- Yeung, E.; Rahman H. y Thorpe T. 1996. Comparative Development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. C.V. Topas. I. Histodifferentiation Int. J. Plant Sci. 157(1):27-39