



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPUS MONTECILLO**

POSTGRADO EN CIENCIAS FORESTALES

**“CARACTERIZACIÓN SEXUAL, PRODUCCIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN
ÁRBOLES Y ESTABLECIMIENTO DE EXPLANTES *in-vitro* DE *Bursera linanoe* (LA
LLAVE) RZEDOWSKI, CALDERÓN & MEDINA EN POBLACIONES DEL ESTADO
DE GUERRERO”**

JUAN GUTIÉRREZ SANTIAGO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2016

**“CARACTERIZACIÓN SEXUAL, PRODUCCIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN
ÁRBOLES Y ESTABLECIMIENTO DE EXPLANTES *in-vitro* DE *Bursera linanoe*
(LA LLAVE) RZEDOWSKI, CALDERÓN & MEDINA EN POBLACIONES DEL
ESTADO DE GUERRERO”**

La presente tesis, titulada: **Caracterización sexual, producción de aceites esenciales en árboles y establecimiento de explantes *in-vitro* de *Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón & Medina en poblaciones del estado de Guerrero**, realizada por el alumno: Juan Gutiérrez Santiago, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
CIENCIAS FORESTALES

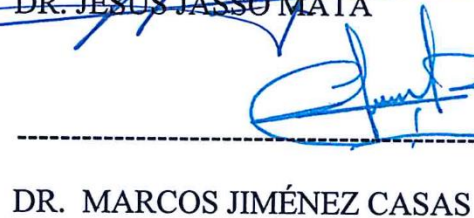
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



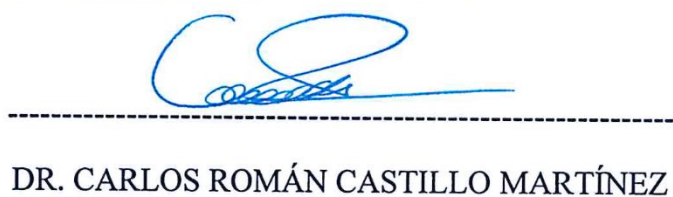
DR. JESUS JASSO MATA

ASESOR:



DR. MARCOS JIMÉNEZ CASAS

ASESOR:



DR. CARLOS ROMÁN CASTILLO MARTÍNEZ

Montecillo, Texcoco, Edo. de México, Marzo 2016

RESUMEN GENERAL

CARACTERIZACIÓN SEXUAL, PRODUCCIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN ÁRBOLES Y ESTABLECIMIENTO DE EXPLANTES *in-vitro* DE *Bursera linanoe* (LA LLAVE) RZEDOWSKI, CALDERÓN & MEDINA EN POBLACIONES DEL ESTADO DE GUERRERO

Juan Gutiérrez Santiago, MC

Colegio de Postgraduados, 2016

Xochicopatl ó linaloe (*Bursera linanoe*, Burseraceae) es un árbol caducifolio, endémico de la selva baja caducifolia en México. La extracción de sus frutos y madera para obtención de aceites esenciales y artesanías, está limitando su capacidad de sus poblaciones para regenerarse naturalmente. Se documentan durante dos años; floración, diámetros, fructificación y peso de aceites en tres poblaciones diferentes. Se observaron flores unisexuales distribuidas en tres tipos sexuales. Las hembras predominaron (~50%) y no se hallaron significativamente más hembras que machos (~20%) y monoicos (~30%) combinados entre sitios ($p=0,8065$). Los árboles dioicos (hembra y macho) mostraron una tendencia de crecimiento diamétrico similar, sin embargo, los árboles monoicos tienden a ser más grandes que ambos dioicos ($p=0.0193$). Durante la fructificación, las hembras mostraron menor variación en número de frutos que los monoicos, sin embargo, ambos sexos muestran rendimiento similar de aceites frutales. Para el establecimiento *in vitro*, se emplearon medios WPM y MS con ocho tratamientos y un testigo. Los medios mostraron mayor influencia ($p=0.03388$) que 18 tratamientos hormonales durante el rebrotamiento de explantes. El sistema sexual de las poblaciones muestreadas no resultó ser poligamodioico, sino subdioico. Los árboles hembra son idóneos para producción de aceite frutal, mientras que los monoicos son idóneos para producción de madera y resinas. La mejor respuesta de rebrotes *in vitro* se obtuvo con el medio WPM.

Palabras clave: Burseraceae, Bursera, linaloe, polimorfismo sexual, aceites esenciales.

GENERAL ABSTRACT

SEXUAL CHARACTERIZATION, ESSENTIAL OILS PRODUCTION ON TREES AND ESTABLISHMENT *in vitro* OF *Bursera linanoe* (LA LLAVE) RZEDOWSKI CALDERON & MEDINA POPULATIONS FROM GUERRERO STATE, MEXICO.

Juan Gutiérrez Santiago, MC

Colegio de Postgraduados, 2016

Linaloe or Indian lavender (*Bursera linanoe*, Burseraceae) is a deciduous tree and endemic from tropical dry forest in Mexico. Fruits and wood extraction for essential oils and handicrafts, is limiting their populations ability to regenerate naturally. We documented through two years; blooming, diameters, fruits numbers and oils weight, in three different populations. Solely unisexual flowers on three sexual types were observed. Females dominated (~50%) and not significantly more females than males (~ 20%) and monoicos (~ 30%) combined between sites ($p=0.8065$) were found. Dioecious trees (female and male) tended to be similar in diametric growth, however, monoecious trees tend to be larger than both dioecious ($p=0.0193$). During fruiting females showed less variation in fruits number than monoecious ones, however, both sexes show similar performance in fruit oils. Establishment *in vitro*, WPM and MS mediums with eight treatments and a control were used. Mediums showed greater influence ($p=0.03388$) to 18 hormonal treatments during explants regrowth. Sexual system of sampled populations did not prove to be polygamodioecious but subdioecious. Female trees are suitable for fruit oil production, while monoecious are suitable for wood and resins production. The best sprouts responses *in vitro*, was obtained in WPM medium.

Keywords: Burseraceae, Bursera, Indian lavender, sexual polymorphism, essential oils.

DEDICATORIA

- ⌘ A mi mentor y consejero... **Dr. Jesús Jasso Mata**

- ⌘ Por los trabajos que valen la pena... Al **Dr. Jerzy Rzedowski Rotter**

- ⌘ Con amor a mi madre **Susana Santiago López**
¡Eres mi gran ejemplo!
Muchas gracias por nunca rendirte de nosotros

A G R A D E C I M I E N T O S

☪ **A LA MANO DERECHA DEL CREADOR, AUTOR Y CONSUMADOR DE LA VIDA**

☪ A todos los mexicanos que pagan impuestos pues me permitieron terminar mis estudios de Maestría a través de las becas otorgadas por el CONACYT

☪ **AL DR. JESÚS JASSO MATA.** Mi sabio mentor y consejero, su guía ha sido de alta estima y gran valor a mi vida profesional

☪ **AL DR. RAMÓN MARCOS SOTO HERNÁNDEZ.** Asesor principal, que con gran empeño aportó ideas y facilidades para el desarrollo de la investigación

☪ **A LA M.C. YANETH JÍMENEZ SALMERÓN, ING. IRIS CRUZ LARIOS, SRA. LUCINA DESIDERIO Y SR. LUIS MÉNDEZ HIDALGO.** Quienes apoyaron en la logística durante la realización de la parte más difícil de la investigación

☪ **AUTORIDADES MUNICIPALES DE MEZQUITLÁN Y COMALA DE GÓMEZ, GUERRERO.** Por las facilidades otorgadas en la realización del monitoreo durante dos años y apoyo técnico en campo

☪ **AL DR. SIMON QUEENBOROUGH Y DRA. LIZA COMITA.** Por sus atentos aportes y apoyo durante la estancia de investigación en el Tropical Resources Institute, Yale School of Forestry and Environmental Studies, New Haven, Ct., EEUU

☪ **AL DR. CARLOS ROMÁN CASTILLO MARTÍNEZ.** Por su dirección y aportes durante la estancia de investigación en el CNRG, Tepatitlán, Jalisco

☪ **AL DR. MARCOS JIMÉNEZ CASAS.** Por formar parte de mi consejo particular y estricta revisión de tesis

☪ **AL DR. JERZY RZEDOWSKI ROTTER.** Por sus sabias ideas aportadas en la clasificación taxonómica y finas críticas al presente trabajo

☪ **AL DR. DOUGLAS C. DALY.** Por su apoyo en la clasificación botánica, durante la visita de investigación en el NY Botanical Garden, Bronx, NYC, EEUU

☪ **A LA M.C. GUADALUPE VARGAS CABRERA.** Por su contribución y apoyo para la realización de este trabajo, además de ser una maestra y amiga excepcional

Con mucho aprecio

תראן

CONTENIDO

Pág.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Etnobotánica mundial de Burseraceae (Daly <i>et al.</i> , 2011).....	1
1.2 Género <i>Bursera</i> en el continente Americano	2
1.3 Historia y distribución natural de <i>Bursera linanoe</i> (La Llave) Rzedowski, Calderón & Medina en México.	2
1.4 Controversia taxonómica en linaloe.....	3
1.5 La sexualidad de linaloe.....	4
2. JUSTIFICACIÓN GENERAL.....	4
3. OBJETIVO GENERAL.....	5
4. CAPITULO 1: PROPORCIÓN SEXUAL DE ÁRBOLES DE LINALOE (<i>Bursera linanoe</i> , Burseraceae) EN TRES RODALES NATURALES DEL ESTADO DE GUERRERO.....	6
4.3.1 Descripción taxonómica de linaloe (Rzedowski <i>et al.</i> , 2004).	10
4.3.2 Características ecológicas de los sitios estudiados.	15
4.3.3 Rasgos sexuales de las flores y sexado de árboles.....	15
4.4 Resultados	17
4.5 Discusión.....	19
4.6 Conclusiones	21
4.7 Recomendaciones.....	21
5. CAPITULO 2: PRODUCCIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN FRUTOS DE ÁRBOLES HEMBRA Y MONOICOS DE LINALOE (<i>Bursera linanoe</i> , Burseraceae) EN TRES RODALES NATURALES, EN EL ESTADO DE GUERRERO.....	22
5.1 Introducción	24
5.2 Objetivos	26
5.2.1 Objetivos particulares:	26
5.3 Métodos.....	26
5.3.1 Características de los sitios y marcado de arbolado.....	26

5.3.2	Rasgos sexuales de las flores y sexado de árboles.....	26
5.3.3	Cosecha de frutos.....	27
5.3.4	Extracción de aceites esenciales	27
5.3.5	Diseño experimental y análisis de resultados	28
5.4	Resultados	28
5.5	Discusión.....	31
5.6	Conclusión.....	33
5.7	Recomendaciones.	33
6.	CAPITULO 3: ESTABLECIMIENTO <i>in vitro</i> DE EXPLANTES VEGETATIVOS DE LINALOE (<i>Bursera linanoe</i> , Burseraceae).	34
6.1	Introducción	36
6.1.1	Macro propagación:	37
6.1.2	Micro propagación:.....	37
6.2	Objetivo.....	39
6.2.1	Objetivos particulares:	39
6.3	Métodos:.....	39
6.4	Establecimiento <i>in vitro</i> de linaloe.....	39
6.5	Preparación de medios de cultivo.....	39
6.6	Tren de desinfección del material vegetal.....	41
6.8	Condiciones de incubación.....	41
6.9	Diseño Experimental y análisis estadístico.	42
6.10	Resultados	42
6.11	Discusión	45
6.12	Conclusión	46
7.	BIBLIOGRAFÍA	47

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. <i>Bursera linanoe</i> (La Llave) Rzed., Calderón & Medina. Ilustrado por Elvia Esparza.	14
Figura 2. Inflorescencias e infrutescencias observadas durante el muestreo en Guerrero.	16
Figura 3. Número de árboles por sexo de <i>Bursera linanoe</i> en tres poblaciones naturales muestreadas y en total. (A=Mezquitlán, B=Comala I, C=Comala II).	17
Figura 4. Comparación sexual del diámetro normal en 150 árboles de <i>Bursera linanoe</i> entre sitios muestreados. (A=Mezquitlán, B=Comala I, C=Comala II).	18
Figura 5. Distribución acumulativa del diámetro normal de árboles de <i>Bursera linanoe</i> muestreados en Guerrero.	19
Figura 6. Monitoreo de fructificación en árboles de <i>Bursera linanoe</i> por sexo en tres sitios.	29
Figura 7. Varianza de muestra, número total y promedio de frutos bien desarrollados de árboles hembra y monoicos.	30
Figura 8. Comparación de la producción frutal y rendimiento de aceites esenciales de 84 árboles en tres sitios de muestreo.....	31
Figura 9. Evaluación de niveles de oxidación. Escala de observación de porcentaje de oxidación en los explantes (de izquierda a derecha; 0, 25,50, 75 y 100%)	42
Figura 10. Mejor explante por tratamiento en el día 20 (a=WPM, b=MS).....	43
Figura 11. Explantes con mejor respuesta por tratamiento (a=WPM, b=MS), en el día 30. ...	45
Figura 12. Ejemplo de las mejores respuestas observadas en 15 explantes del tratamiento 11(WPM).	46

LISTA DE CUADROS

Pág.

Cuadro 1.	Análisis de varianza del DN de árboles de <i>Bursera linanoe</i> de acuerdo a sexo y sitio.	18
Cuadro 2.	Regresión lineal del DN por tipo sexual de 150 árboles de <i>Bursera linanoe</i> .	19
Cuadro 3.	Análisis de varianza en peso de frutos de 30 árboles de linaloe.	30
Cuadro 4.	Análisis de varianza en porcentaje de aceites esenciales de 30 árboles	31
Cuadro 5.	Número de tratamientos y el stock hormonal suplementado.	40
Cuadro 6.	Resultados obtenidos en la evaluación del día 30.	44
Cuadro 7.	Análisis de varianza de brotes en relación medios + tratamientos.	44

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Etnobotánica mundial de Burseraceae (Daly *et al.*, 2011)

Burseraceae es una familia de árboles y arbustos que se conforma por aproximadamente 700 especies agrupadas en 19 géneros en los trópicos y subtrópicos, representados por escasas taxa en algunas zonas cálidas del mundo. Esta familia es mejor conocida por el incienso (*Boswellia* spp.), la mirra y el bálsamo de Galaad (ambas *Commiphora* spp.), junto con otras especies de fama bíblica (Zohary, 1982) aunque el auge de importancia de la familia se dio durante las antiguas rutas de comercio mucho antes de la era cristiana. Hay evidencias arqueológicamente bien conocidas desde más de 14, 000 años, sugiriendo que *Canarium* puede ser la especie domesticada más antigua en Melanesia (McClatchey *et al.*, 2006).

Al rededor del 2,800 a. c., el rey Isesi de Egipto organizó expediciones a Eritrea para incienso; la reina Egipcia Hatshepsut introdujo plantas de *Boswellia* y *Commiphora* a la misma región en el siglo 15 a.c. Más tarde Alejandro el grande hizo lo mismo al enviar a Anaxicrates a Yemen y Omán, con el mismo propósito en el cuarto siglo a.c.

El uso de resinas de las Burseraceae en el nuevo mundo, fue anterior al contacto Europeo. Por ejemplo, el copal burseráceo de los aztecas fue de tremenda significancia ritual (Stacey *et al.*, 2006), y el uso de la resina de Burseraceae para sellar canoas fue observado en la amazonia brasileña durante el siglo 17 (Cristoñao de Lisboa, 1968).

La longeva historia humana de las Burseraceae dejó mucha confusión acerca de las fuentes botánicas (p, e., Lindley, 1853; Marchand, 1867–1868), pero éstas están en su mayoría resueltas (p, e., Tucker, 1986; Thulin and Warfa, 1987; Thulin and Claeson, 1991).

La domesticación y la introducción de Burseraceae ha tomado importancia en muchos tiempos, incluyendo las grandes plantaciones de la especie Mexicana *Bursera delpechiana* en la India antes que el linalol sintético fuera desarrollado.

De aquí que ha sido muy relevante la convergencia de usos para la familia Burseraceae a través de los trópicos. Los han usado como sellador para canoas, iluminación, gomas o barnices, leña, repelentes o insecticidas, o para tratar la inflamación y reumatismo, tratar desordenes pulmonares, y enfermedades de la piel, cercos vivos (*Bursera* y *Commiphora*), semillas y mesocarpo comestible (*Canarium* y *Dacryodes*) y la importancia ritual en localidades de amplio rango como en el oeste de África (Raponda-Walker y Sillans, 1961; Arbonnier, 2002; Las

Filipinas (Quisumbing, 1951; Coronel, 1996), y la Amazonia (Grimes *et al.*, 1994; Machado *et al.*, 2003; pers. obs.). Usos adicionales para Burseraceae incluyen venenos para flechas (Thulin, 1993), y tratamientos para las enfermedades venéreas (Arbonnier, 2002).

En un contraste ambiguo a los tiempos antiguos, la familia Burseraceae es de poca importancia actual en el comercio internacional, una excepción del okoumé (*Aucoumea klaineana*), la más importante especie maderable de la depresión del Congo (p, e., Ruiz Pérez *et al.*, 2005).

1.2 Género *Bursera* en el continente Americano

En el continente americano, de acuerdo con Rzedowski y Kruse (1979), los árboles del género *Bursera* incluyen aproximadamente un centenar de especies que se distribuyen desde el sur de los Estados Unidos hasta Perú y el sur de Brasil, siendo México su centro de diversificación con más de 80 especies.

Éstas son parte esencial constitutiva de muchas comunidades naturales maduras o sucesionalmente tardías, siendo dominantes en algunas, especialmente en las selvas bajas caducifolias o también llamados bosques tropicales caducifolios.

1.3 Historia y distribución natural de *Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón & Medina en México.

El linaloe (*B. linanoe*) se encuentra distribuido ampliamente a todo lo largo de la cuenca del Río Balsas, en una extensión aproximada de 20 kilómetros a los lados y abarca los estados de Guerrero, Puebla, Morelos, Oaxaca y Veracruz (Colina, 1987; Diaz-Castro, 2009). La distribución está restringida a ciertas regiones occidentales del país, pero debido a la sobre explotación de la que fue objeto hace más de medio siglo, cambio de uso de suelo y a la tala inmoderada de los bosques por los agricultores, ganaderos y artesanos, la especie se encuentra limitada a zonas cada vez más reducidas (Joy *et al.*, 2001; Diaz-Castro, 2009). Según Gunther (1972), citado por Hersch-Martínez y Glass (2006), el linaloe fue motivo de una explotación intensiva para destilar aceite esencial altamente apreciado en el mercado aromático Nacional e internacional, a través de una práctica extractiva rudimentaria de la cual quedan aún diferentes vestigios de diversas comunidades de la cuenca del río Balsas. Principalmente en los estados de Guerrero, Morelos y Puebla dicha práctica se llevó a cabo de manera exhaustiva principalmente a lo largo de la primera mitad del siglo pasado, con el fin de exportar aceite, resultando una

severa disminución en la disponibilidad de los árboles en una vasta región de la cuenca, aunque la destilación se realizaba también a partir de sus frutos pero en menor escala.

1.4 Controversia taxonómica en linaloe

Rzedowski *et al.* (2004) sostienen que linaloe, es el nombre actual que identifica a la especie de interés en este estudio, ya que su registro en diferentes épocas, causó gran controversia pues se le describe con varias sinonimias, tales como *Amiris linanoe* (1832), *Elaphrium aloëxylon* (1843), *Bursera aloexylon* (1881); Ignacio La Llave, *Bursera delpechiana* (1883), *Terebinthus aloexylon* (1906), *Terebinthus delpechiana* (1906); Schiede ex Schltdl., *Elaphrium delpechiana* (1911); Poisson ex Engl., *Elaphrium longipedunculatum* (1911); Rose, y *Bursera longipedunculata* (1929) ; Rose & Standl.

De las diferentes sinonimias asignadas *B. delpechiana* es relevante a nivel internacional y se conoce como la especie más plantada de su género en el mundo (Becerra and Noge, 2010), mientras que *B. aloexylon* fue últimamente su nombre taxonómicamente popular en México (Hersch-Martínez, 2004; Rzedowski *et al.*, 2004).

También los nombres comunes son variables acorde a las zonas de distribución: copalillo, linaloé, ulinoé, inanué, linaloe, linalué, ulinalué, xoxhicopal (Rzedowski *et al.*, 2004).

Linaloe fue descrito por Poisson en 1922, con base en un ejemplar procedente de ‘Real de Cuantla’, recolectado por el cónsul Delpeche, de aquí el epíteto delpechiana, y que hoy en día resalta su importancia comercial en la India en 600 hectáreas de cultivo localizados en Karnataka y con cultivos experimentales en los estados vecinos de Andhra Pradesh y tamil nadu, con niveles de rendimiento de aceite de 2 a 3 toneladas por año, la mayor parte de la producción es exportada a Reino Unido y Francia, para elaboración de perfumes finos, también empleado en la industria del jabón así como para dar sabor a los alimentos y bebidas, se utiliza como germicida en medicina, también puede servir como un sustituto del aceite de lavanda verdadera obtenidos a partir de *Lavandula angustifolia* Mill., etc. (Joy *et al.*, 2001)

Es necesario aclarar que, la destilación de los frutos es posible solamente en especímenes hembra, pues la especie es dioica. Joy *et al.* (2001) menciona que casi todas las partes del árbol de linaloe contienen aceite, en México durante la segunda guerra mundial se destilaba a partir de la madera triturada, mientras que en la India hoy en día usa el pericarpio de los frutos. El rendimiento de aceite de cáscara es mucho menor, de 1.8% en comparación con 2.5 a 3.0%

obtenido de la madera en México. Sin embargo, la madera calada puede ser tomada de individuos de ambos sexos o bien solo de aquellos que no producen frutos (machos) (Hersch-Martínez y Glass, 2006). Por lo tanto ha de plantearse la necesidad de investigar si hay diferencias tecnológicas significativas entre la madera de árboles hembras y machos.

La importancia del linaloe es imponderable ya que naturalmente cumple su rol ecológico básico como refugio y alimento faunístico. También se utiliza como cercos vivos, cortinas rompe vientos, ornato, y su madera tiene adscripción a una actividad artesanal única de México en el estado de Guerrero. Además se enmarca que la especie de interés fue adscrita a la norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 (Juárez-Luke, 2006).

1.5 La sexualidad de linaloe

Según Rzedowski *et al.* (2004) existen dificultades que limitan el conocimiento taxonómico de las especies del género *Bursera* entre ellas:

- a) La sexualidad de las especies, siendo en su mayor porción dioicas o poligamodioicas.
- b) La distribución geográfica intraespecífica restringida que presentan numerosas especies en áreas reducidas.
- c) El desconocimiento de la variabilidad morfológica foliar que deriva en una equivocación en la delimitación de los taxa.
- d) La morfotaxonomía no es suficiente, se necesitan estudios quimiotaxonómicos finos y de tipo molecular para la clasificación de especies.
- e) Las diferencias aromáticas causan confusión, pues todas sus especies producen terpenos.
- f) La hibridación intraespecífica genera individuos con rasgos intermedios y no permiten la distinción entre los taxa.

La estrategia reproductiva de nuestra especie de interés es señalada por Rzedowski *et al.* (2004), y se cataloga como una especie poligamodioica (poblaciones de algunas plantas con flores estaminadas y perfectas y otras plantas con flores pistiladas y perfectas según Geber *et al.*, 1999), sin embargo, este señalamiento no ha sido explorado con precisión hasta ahora.

2. JUSTIFICACIÓN GENERAL

Aunque muchas especies de *Bursera* nativas de México tienen el potencial de desarrollo forestal como *B. glabrifolia* con una amplia distribución en el país, linaloe es prioritario por ser

considerado un árbol aromático de relevancia que acapara la atención internacional, pues es altamente demandado como materia prima para extracción de preciados aceites esenciales y madera para artesanías.

Aunada a sus ostentosas bondades se le confiere una importancia especial dentro de la restauración ecológica ya que su establecimiento en sitios perturbados permite acelerar la sucesión natural y ayuda a restablecer la composición y estructura de las comunidades de clima cálido, pues puede adaptarse a suelos degradados (Bradshaw, 1987); Vázquez-Yanes *et al.*, 1999; SER, 2002; Bonfil-Sanders *et al.*, 2007); según Joy *et al.*, 2001 “este árbol es muy resistente y florece incluso en suelos rocosos, así como en suelo franco arenoso profundo”.

Chomchalow (2002), menciona que China, India, Indonesia, Nepal, Sri Lanka y Tailandia producen aceites esenciales a nivel industrial. El manejo ancestral para la cosecha de las plantas aromáticas en Asia se ha desarrollado a partir de la colecta en rodales naturales como provisión a bajo costo para el uso de extracción industrial de aceites esenciales, es hoy muy común en zonas rurales, sin embargo, se halló como ventaja del cultivo comercial; la producción de material uniforme, debido al cultivo comercial de clones selectos o variedades mejoradas. Tales materiales contienen estándares consistentes de alta calidad, un pre requisito para el éxito del sabor y fragancias a nivel industrial.

Debido a la gran relevancia del cultivo de linaloe en oriente esta investigación observa el problema de la distribución y características sexuales de algunas poblaciones, las dificultades que tiene al reproducirse de manera natural para reforzar substancialmente las poblaciones y por ende evitar la desaparición de linaloe en su área de distribución natural.

Se sabe que linaloe es una especie típicamente dioica y con poco éxito reproductivo, por lo que a su vez se sugiere la exploración de su estrategia reproductiva para propiciar la oportunidad de un manejo y uso dirigido con individuos de calidad superior para plantaciones de alto rendimiento a manera de respuesta urgente y eficaz.

3. OBJETIVO GENERAL

Explorar el complejo sexual de linaloe en poblaciones naturales para producción sustentable de madera, aceites esenciales y obtener un protocolo de propagación *in vitro*.

4. CAPITULO 1: PROPORCIÓN SEXUAL DE ÁRBOLES DE LINALOE (*Bursera linanoe*, Burseraceae) EN TRES RODALES NATURALES DEL ESTADO DE GUERRERO

^aJuan Gutiérrez Santiago, ^aJesús Jasso Mata, ^bRamón Marcos Soto Hernández, ^cSimon Alexander Queenborough, ^dJerzy Rzedowski, ^aMarcos Jiménez Casas

^a Postgrado en Ciencias Forestales, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Texcoco Edo. México. C.P. 56230. Tel. +52 01(595)952-0200, ext. 1468. E-mail: jejama@colpos.mx

^b Postgrado en Botánica, Colegio de Postgraduados, Montecillo. msoto@colpos.mx

^c Yale School of Forestry & Environmental Studies, Yale University, New Haven, Ct, USA. E-mail: simon.queenborough@yale.edu

^d Instituto de Ecología, Pátzcuaro, Michoacán, Méx. Retirado. E-mail: jerzyrzedowski@inecol.mx

RESUMEN

La madera, resina, y aceites esenciales del xochicopatl, lavanda india o linaloe se cosechan para diferentes usos industriales, rituales y artesanales, sin embargo, la sobre extracción afecta la regeneración de sus poblaciones naturales. La obtención de frutos y el derribo elimina virtualmente la posibilidad de propagación sexual, por lo que estas poblaciones deben ser manejadas sustentablemente. Se documentan 150 árboles en tres sitios del estado de Guerrero para analizar sus patrones de crecimiento en relación al sexo. Únicamente se hallaron flores unisexuales; estaminadas en árboles macho, pistiladas en árboles hembra, y ambas unisexuales en árboles monoico. La proporción sexual encontrada en nuestro estudio fue similar entre sitios, sin embargo, en los tres sitios dominaron las hembras, seguidas de los monoicos, reduciendo la existencia de machos, lo cual caracteriza a la subdioecia. En nuestro estudio, las hembras no poseían mayor diámetro que los machos, mientras que los monoicos tienden a ser más grandes que ambos dioicos, lo cual tiene implicaciones económicas en la administración sustentable de las poblaciones naturales.

Palabras clave: Burseraceae, Bursera, polimorfismo sexual, xochicopatl, linaloe.

CAPITULO 1: PROPORCIÓN SEXUAL DE ÁRBOLES DE LINALOE (*Bursera linanoe*, *Burseraceae*) EN TRES RODALES NATURALES DEL ESTADO DE GUERRERO

^aJuan Gutiérrez Santiago, ^aJesús Jasso Mata, ^bRamón Marcos Soto Hernández, ^cSimon Alexander Queenborough, ^dJerzy Rzedowski, ^aMarcos Jiménez Casas

^a Postgrado en Ciencias Forestales, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Texcoco Edo. México. Z.C. 56230. Tel. +52 01(595)952-0200, ext. 1468. E-mail: jejama@colpos.mx

^b Postgrado en Botánica, Colegio de Postgraduados, Montecillo. msoto@colpos.mx

^c Yale School of Forestry & Environmental Studies, Yale University, New Haven, Ct, USA. E-mail: simon.queenborough@yale.edu

^d Instituto de Ecología, Pátzcuaro, Michoacán, Méx. Retired. E-mail: jerzyrzedowski@inecol.mx

ABSTRACT

Wood, resin, essential oils from Indian lavender are harvested for industrial uses, handicrafts and ritual uses, however, removal affects regeneration in natural populations. Fruit harvest and logging virtually eliminates possibility of sexual reproduction, so these populations must be managed sustainably. 150 trees are documented in three stands of Guerrero state in Mexico, to analyze growth patterns in relation to sex. Solely unisexual flowers were observed; estaminates in male trees, pistilates in female trees, and both unisexual monoecious trees. Sexual rates in this study were similar between stands; however, females are dominants, followed by monoecious reducing existence of males, which characterize subdioecious populations. In our study, females were not mayor diameter than males; while monoecious tend to be larger than both dioecious, which has economic implications for sustainable management of natural populations.

Keywords: Burseraceae, Bursera, sexual polymorphism, Indian lavender, linaloe.

4.1 Introducción

Xochicopatli, linaloe o lavanda India es un árbol dioico, aromático, endémico y dominante en la selva baja caducifolia en México (Rzedowski *et al.*, 2004). Su madera, resina, y aceites esenciales se cosechan para uso en cosméticos, medicinas, rituales y artesanías, además generan ingresos significativos para las personas en las zonas rurales pobres (Hernández-Vásquez *et al.*, 2013) sin embargo, la sobre extracción de sus frutos y la tala sexual indiscriminada de árboles de gran tamaño en general para madera y extracción de aceite, están limitando la capacidad de estas poblaciones arboladas para regenerarse, además que la cosecha de frutos sólo es posible a partir de árboles con flores pistiladas funcionales, eliminando virtualmente la propagación sexual. Este derribo indiscriminado de árboles grandes, sugiere una erosión genética, así como la eliminación de un gran potencial fuente de polen y semillas (Hersch-Martínez & Glass, 2006) por lo cual estas poblaciones deben urgentemente ser preservadas y gestionadas de manera sostenible (Hersch-Martínez, 2004).

La investigación efectuada hasta hoy, se ha centrado en: propagación sexual (Bonfil-Sanders *et al.*, 2008; Ramos-Ordoñez *et al.*, 2013), propagación vegetativa para la restauración de áreas nativas (Bonfil-Sanders *et al.*, 2007; Castellanos & Bonfil, 2010) y un rústico manejo forestal (Hernández-Apolinar *et al.*, 2006). Sin embargo, poco se sabe acerca de la expresión sexual en *Bursera*, la variación en la proporción de sexos en floración, los conductores de la variación en la producción de frutos, el contenido de aceite y multiplicación vegetativa, en las poblaciones naturales, información necesaria para su manejo sostenible.

La diversidad de estrategias reproductivas en las plantas ofrecen una amplia variabilidad genética intraespecífica de la cual depende la reproducción. Las características de cada sistema sexual conllevan a una interacción con la cantidad de recursos ecológicos disponibles así como la participación de polinizadores y dispersores que son determinantes para el éxito reproductivo. Esta información es crucial para la restauración ecológica en los bosques secos que están en peligro de extinción (Hilje *et al.*, 2015).

Según Daly *et al.* (2011) en la familia Burseraceae se documentan algunos taxones que muestran un marcado dimorfismo sexual en donde las flores son usual y estructuralmente bisexuales, ya sea con un pistilo rudimentario que carece de estigmas o estaminodios que carecen de polen, flores actinomorfas unisexuales o menos frecuentes bisexuales.

En toda la familia Burseraceae, en el género y subgénero *Bursera* se describen ejemplares bisexuales con flores hermafroditas pero con alguna atrofia sexual, lo que las convierte en funcionalmente unisexuales (en sentido taxonómicamente estricto la funcionalidad se describe como la formación de frutos con semillas viables), además el término bisexual ha sido confundido y empleado como un sinónimo del hermafroditismo, a veces refiriéndose no solo a flores perfectas, a plantas con flores perfectas, o bien, individuos con ambas flores unisexuales en la misma planta (Geber *et al.*, 1999) por lo que procuramos evidenciar esta disparidad y hacer una exploración de los rasgos sexuales y fenotípicos que pudieran esclarecer la estrategia reproductiva de linaloe.

Para nuestra exploración, teóricamente se argumenta que la mayoría de plantas dioicas no son totalmente dimórficas, y frecuentemente suelen tener grandes diferencias inter-sexuales en sus patrones de crecimiento y en la distribución proporcional de recursos para la reproducción (Lloyd & Webb, 1977). Hay un mayor costo de reproducción gamética en las hembras que en los machos (Darwin, 1877; Lloyd & Webb, 1977; Charnov, 1982) y este costo diferencial de reproducción entre los sexos tiene consecuencias que se expresan en diferentes formas en diferentes plantas.

Las diferencias observadas frecuentemente incluyen floración precoz y un crecimiento reducido en machos, mientras que un mayor esfuerzo reproductivo y preferencias locales de los hábitats es observado en las hembras. Estudios previos en el Neo y Paleo trópico han sugerido que los árboles tropicales también observan estos patrones de diferencias inter-sexuales de crecimiento. Sin embargo, estos estudios generalmente no han censado todo el potencial reproductivo individual y no siguiendo los mismos árboles durante diferentes épocas de floración (no más de dos años), de esta forma se ha documentado que algunos árboles tropicales no cambian su sexualidad, sin embargo, algunas especies tropicales presentan inconstancia en la producción frutal (Queenborough *et al.*, 2007), lo cual complica el sexado de árboles caducos en épocas de sequía, pues se hallan desnudos como en nuestra especie de interés.

Por tal motivo es necesario tomar en cuenta la metodología que Queenborough *et al.* (2007) sugiere en árboles tropicales, una vez observada la floración se medirá el diámetro normal (DN), como un rasgo fenotípico que pudiera dar luces de las diferencias intersexuales que expresa nuestra especie de interés durante dos años de muestreo.

En este estudio, al documentar la expresión sexual, de 150 árboles de *Bursera linanoe* de tres poblaciones durante dos años, abordamos las siguientes preguntas:

1. ¿Cuántos tipos sexuales de flores y cómo se distribuyen entre árboles de las tres poblaciones a estudiar?
2. ¿El sexo de los árboles observados difiere en sus patrones de crecimiento diamétrico?

4.2 Objetivos

Explorar las diferencias intersexuales y del crecimiento diamétrico en árboles de linanoe y determinar la implicación de su estrategia sexual.

Objetivos particulares:

- Documentar los tipos sexuales y arreglo de flores en cada árbol y describir la distribución sexual en tres poblaciones naturales del estado de Guerrero
- Analizar el patrón de crecimiento diamétrico (DN) por tipo sexual
- Identificar la estrategia sexual en las tres poblaciones de árboles

4.3 Métodos

4.3.1 Descripción taxonómica de linaloe (Rzedowski *et al.*, 2004).

Bursera linanoe (La Llave) Rzedowski, Calderón & Medina, comb. nova. *Amiris linanoé* La Llave, Reg. Trim. 1: 356. 1832. *A. linaloé* La Llave, La Naturaleza 7, apénd. p. 73. 1884. Tipo: México: La Mixteca (sin haberse localizado). Neotipo que aquí se designa: México: Oaxaca: distrito Teotitlán: camino a Huautla de Jiménez, 12.VIII.1978, F. Ventura 15356 (holoneotipo IEB, isoneotipos por distribuirse).

Elaphrium aloëxylon Schiede ex Schltdl. Linnaea 17: 252. 1843. *Bursera aloexylon* (Schiede ex Schltdl.) Engl. Bot. Jahrb. 1: 44. 1881. *Terebinthus aloexylon* (Schiede ex Schltdl.) W. F. Wight ex Rose, Contr. U.S. Nat. Herb. 10: 118. 1906. Tipo: México: Morelos: Real de Huautla, VII.1835, C. J. W. Schiede 1003 (holotipo HAL).

Bursera delpechiana Poisson ex Engl., DC. Monogr. Phaner. 4: 53. 1883. *Terebinthus delpechiana* (Poisson ex Engl.) Rose, Contr. U.S. Nat. Herb. 10: 119. 1906. *Elaphrium delpechianum* (Poisson ex Engl.) Rose, North Amer. Fl. 25: 253. 1911. Tipo: México: Morelos: Cuautla, N. Delpech s. n., 1879 (holotipo P!).

Elaphrium longipedunculatum Rose, North Amer. Fl. 25: 254. 1911. *Bursera longipedunculata* (Rose) Standl, Publ. Field Mus. Nat. Hist. Bot. Ser. 4: 217. 1929. Tipo: México: Oaxaca: distrito Cuicatlán: near Almoloyas, 2.IX.1906, J. N. Rose y J. S. Rose 11282 (holotipo US).

Nombres comunes registrados en la zona: copalillo, linaloé, linanoé, ulinoé. Nombres comunes registrados fuera de la zona de estudio; inanué, linaloe, linalué, ulinalué, xochicopal.

Árbol dioico o a veces polígamo-dioico, hasta de 8(10) m de alto, muy resinoso, con aroma agradable y penetrante al estrujarse; tronco hasta de 60 cm de diámetro, con corteza gris-rojiza, no exfoliante, ramillas lignificadas francamente rojizas oscuras, glabras o las más jóvenes a veces densamente pubérulas o esparcidamente vilosas; hojas con frecuencia aglomeradas en los ápices de ramillas cortas, otras veces alternas en ramillas de crecimiento nuevo, precedidas en su aparición por un conjunto de catafilos lanceolados a angostamente ovados, de 6 a 10 mm de largo, agudos a redondeados en el ápice, densa y muy finamente glanduloso-pubérulos en ambas caras, con frecuencia ciliados en el margen, precozmente caducos, hojas por lo general imparipinnadas, de 6 a 12(15) cm de largo y 3 a 8(10) cm de ancho, peciolo de 1 a 3 cm de largo, viloso o esparcidamente glanduloso-pubérulo, foliolos (3)5 ó 7(11?), raquis con alas de margen entero, hasta de 2(2.5) mm de ancho de cada lado, notablemente más anchas hacia el extremo distal del entrenudo, peciólulos de 0.3 a 1 mm de largo, foliolos ovados a elípticos, lanceolados u oblongos, el terminal a menudo subróbico, de 1.2 a 3(4) cm de largo, de 0.8 a 1.8(2) cm de ancho, agudos a redondeados en el ápice, cuneados a redondeados en la base, toscamente serrados a crenados en el margen y a veces con tendencia a doblemente serrados (con escotadura en el ápice de los dientes), de textura membranácea, algo brillantes en el haz, con venación prominente en el envés, con pelos de ca. 0.6 mm de largo y a menudo también acompañados de diminutos pelos glandulosos espaciados; inflorescencias racimoso-paniculadas, hasta de 6(8) cm de largo y hasta con 35 flores, aunque por lo general mucho más modestas, vilosas y glanduloso-pubérulas, bracteolas linear-subuladas, de ca. 2 mm de largo, pedicelos de 3 a 8 mm de largo; flores masculinas tetrámeras, lóbulos del cáliz triangulares, de 0.6 a 0.8 mm de largo, glanduloso-pubérulos y esparcidamente vilosos, pétalos blanquecinos, oblongos a oblanceolados,

de 3 a 4 mm de largo, glanduloso-pubérulos y vilosos por fuera, estambres 8, filamentos de 1.5 a 2 mm de largo, anteras oblongas, de 0.9 a 1.2 mm de largo, gineceo vestigial; flores femeninas semejantes a las masculinas, pero con los pétalos de ca. 2 mm de largo, estaminodios con anteras de 0.7 a 0.8 mm de largo, ovario bilocular, estilo evidente, a veces con dos ramas libres casi hasta la base, estigmas 2; pedúnculos fructíferos hasta de 4 cm de largo, pedicelos ligeramente engrosados, hasta de 9(12) mm de largo, frutos hasta 8 por infrutescencia, pero no pocas veces solitarios, bivalvados, obovoides y a menudo atenuados en el ápice, pero algo comprimidos, de 9 a 11 mm de largo, de ca. 8 mm de ancho, glabros, rojizos en la madurez, hueso sublenticular o plano-convexo, de 5 a 6 mm de diámetro, a menudo más ancho que largo, cubierto en la mitad o en los 2/3 inferiores por un pseudoarilo anaranjado, la porción expuesta negra.

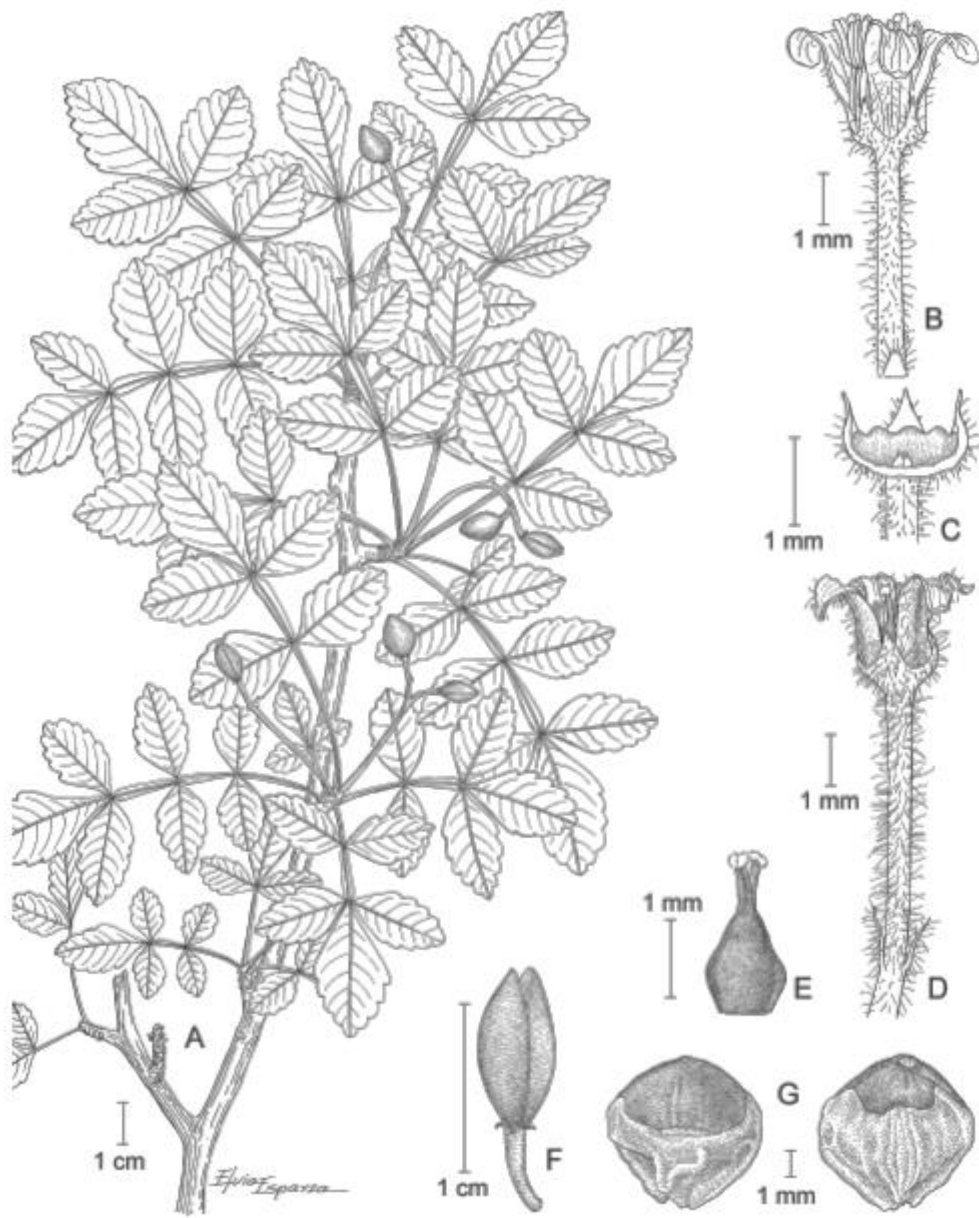
Habitante relativamente frecuente del bosque tropical caducifolio y de algunos matorrales xerófilos, sobre diversos sustratos geológicos, en altitudes de 650 a 1500 m. Florece de mayo a principios de julio. Se encuentra desprovisto de follaje de noviembre a mayo.

Especie endémica del sur de México, conocida de Morelos, Puebla, Guerrero y Oaxaca.

Durante años a esta especie se le conoció con el nombre de *B. aloexylon*, pero el epíteto de La Llave tiene prioridad cronológica y no hay duda acerca de la identidad de este último, pues el mismo Schiede, quien en aquellos años vivía en la ciudad de México, lo menciona en su protólogo. Infortunadamente no se conoce el paradero del material original en que se basó La Llave para su descripción y es muy factible que tales ejemplares ya no existan. En el herbario histórico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, que puede consultarse en la biblioteca José María Lafragua, se encuentra un espécimen estéril de la planta en cuestión procedente de “La Mixteca”, que está identificado como *Amiris linaloe*, sin datos de colector, ni fecha. La Llave a este respecto indica en la misma página 356: “Empeñado en ver las flores de este vegetal, se las encargué a un residente de la Mixteca, y de cuya eficacia estaba seguro, y su diligencia fue tal, que me puso un propio inmediatamente, con un saco en que había ramas y hojas frescas, con una gran porción de frutos, pero desgraciadamente sin una flor siquiera, que era lo que más interesaba. Lo mismo le sucedió al Sr. D. Antonio Cal, que como yo, sólo obtuvo hojas y semillas, de todo lo que mandó ejemplares”. Probablemente el espécimen depositado en Puebla es el que ha identificado y herborizado el propio Antonio Cal, pero no hay indicio claro de que lo hubiera examinado directamente Pablo de La Llave. En tal circunstancia se estimó apropiado designar un neotipo para el binomio *Amiris linanoe*. Con cierta frecuencia se ha estado

usando asimismo para la especie en cuestión el nombre de *B. delpechiana*, basado en un ejemplar con flores masculinas y hojas muy tiernas. La comparación del tipo correspondiente con materiales modernos de *B. linanoe*, muestreados en similar estado fenológico, claramente indican que se trata del mismo taxón.

El tipo de *Elaphrium longipedunculatum* fue colectado en la región de estudio y discrepa un poco en sus hojas ligeramente más grandes que las que más comúnmente se observan, pero coincide en los demás caracteres de hojas y frutos. Bullock (op. cit., p. 374) consideró a *B. delpechiana* como sinónimo de *B. penicillata* (DC.) Engl., pero ya Rzedowski y McVaugh (op. cit., p. 335) rectificaron esta incorrecta interpretación. *Bursera linanoe* se asemeja en muchos aspectos y con frecuencia se confunde en los herbarios con *B. glabrifolia*. Un comentario más detallado sobre este particular se incluye al final de la discusión de esta última especie. El linaloe se conoce mundialmente por el fino aroma de su aceite esencial, que se ha estado explotando en forma intensiva y exportando a Europa en el siglo XIX y en las primeras décadas del XX. Tan atractivo resultó este producto que unos ingleses se llevaron propágulos de plantas mexicanas a la India, país que en la actualidad abastece de tal sustancia a las industrias especializadas en diferentes partes del mundo. En el estado de Guerrero la madera perfumada de linaloe se utiliza para la elaboración de artesanías. En la región de estudio la especie se emplea con propósitos medicinales.



Nota.- A. rama con hojas y frutos; B. flor masculina; C. flor masculina desprovista de un segmento del cáliz, de los 4 pétalos y del androceo; D. flor femenina; E. pistilo; F. fruto; G. hueso visto por ambas caras.

Figura 1. *Bursera linanoe* (La Llave) Rzed., Calderón & Medina. Ilustrado por Elvia Esparza.

4.3.2 Características ecológicas de los sitios estudiados.

Hersch-Martínez (2009) describe las condiciones que el linaloe se desarrolla, siendo de hábitad semiárido, propio de la selva baja caducifolia (Miranda, 1942) o bosque tropical caducifolio, sobre terrenos ondulados con suelos someros y pedregosos, y alcanza entre cinco y ocho metros de altura (Guízar y Sánchez, 1991), se desarrolla en suelos de rendizas, litosoles y regosoles calcáreos, en pendientes de 40 a 60%, tiene preferencias por rocas volcánicas o sedimentarias de origen volcánico que son rasgos característicos del complejo balsas y el cañón del zopilote (Toledo, 1982). Los climas son cálido seco y cálido subhúmedo, con una precipitación media anual de 780 a 1000 mm, y temperaturas máximas y mínimas mensuales que oscilan entre los 22 y los 30 grados centígrados, aunque pueden ser aún más altas. El rango de altitud se encuentra entre los 650 y los 1500 msnm (Rzedowski *et al.*, 2004).

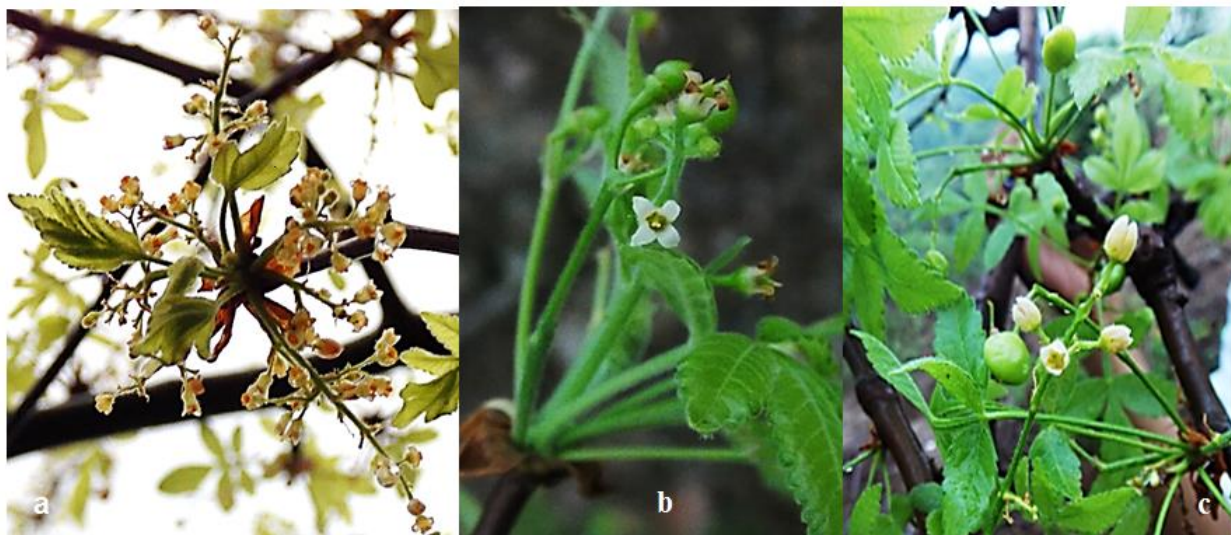
Bajo las condiciones previamente descritas se muestrearon tres sitios de linaloe en selva baja caducifolia de la vertiente del Río Balsas, estado de Guerrero: Uno de los sitios (Sitio A) en el paraje “El calvario” Mezquitlán, Municipio de Copalillo (18° 01’17.30” N, 98°56’54” O), este lugar se encuentran perturbado debido a la cercanía de la población, extracción del fruto, madera y pastoreo. Dos sitios mejor conservados en Comala de Gómez, Municipio de Atenango del Río (18°09’18.40”N, 99°04’05.47”O) en el paraje “Llano la herradura” a riveras del Río Atenango (Sitio B) y en el paraje “La peña” (sitio C). Los tres sitios entre laderas con disposición preferentemente este a una altitud entre 650 a 750 msnm, suelo muy pobre, pedregoso-arenoso en pendientes pronunciadas.

En 2014 y 2015, fueron enumerados con aerosol 150 árboles de linaloe, con ayuda de la clave de identificación de Rzedowski *et al.* (2004), dos guías miembros de la comunidad y por medio del aroma de las hojas, se tomaron al azar 50 árboles por sitio y se geo posicionaron con un (Gpsmap 76S garmin®), se registró también la altura usando una pistola haga®, y diámetro normal (1.3 m) con una cinta diamétrica.

4.3.3 Rasgos sexuales de las flores y sexado de árboles.

Se observó el fenómeno de floración en rodales naturales en mayo con las primeras lluvias anuales de 2014 y 2015 para determinar el sexo en árboles de linaloe.

El sexado floral se realizó identificando cuidadosamente con ayuda de binoculares y un vernier, los órganos reproductivos de acuerdo a (Rzedowski *et al.*, 2004), donde flores masculinas tetrámeras, lóbulos del cáliz triangulares, glanduloso-pubérulos y esparcidamente vilosos, pétalos blanquecinos, oblongos a oblanceolados, glanduloso-pubérulos y vilosos por fuera, estambres 8, anteras oblongas de color amarillo cobrizo intenso muy vistosos (a, b, Figura 2) y algunas con gineceo vestigial, mientras que flores femeninas semejantes a las masculinas, estilo a veces con dos ramas libres casi hasta la base, estigmas 2 de color lechoso evidentes y escasas flores con estaminodios, y se observó el subsecuente desarrollo del fruto para verificar su sexo en agosto 2014 donde los pedúnculos fructíferos hasta de 4 cm de largo, pedicelos ligeramente engrosados, frutos hasta 8 por infrutescencia, pero no pocas veces solitarios, bivalvados, obovoides y a menudo atenuados en el ápice, pero algo comprimidos, glabros, rojizos en la madurez (c, Figura 2).



- a) Inflorescencia estaminada, árbol 39 racimo de flores unisexuales estaminadas (macho).
- b) Inflorescencia pistilada, árbol 36 nótese coloración de estigmas en flor unisexual pistilada, frutos incipientes (hembra).
- c) Inflorescencia e infrutescencia en árbol 33, nótese del mismo árbol dos ramas con sexo diferente, estambres amarillos de flores estaminadas y frutos incipientes (monoico).

Figura 2. Inflorescencias e infrutescencias observadas durante el muestreo en Guerrero.

A los individuos con flores estaminadas, fueron colectados flores, para la posible obtención del polen por separado. También se observó la polinización, se subraya que durante este fenómeno el ambiente es muy húmedo debido a la lluvia, y es casi nula la posibilidad de reproducción

anemófila de la especie, por lo que los agentes polinizadores aprovechan al máximo la luz del sol para la recolección de polen y néctar.

Se empleó el paquete estadístico R para el análisis de datos obtenidos, en el cual se realizaron pruebas de proporción de sexos en los diferentes sitios, así como una regresión lineal para modelar la relación sexo y patrón de crecimiento diamétrico de un solo año (2015).

4.4 Resultados

En todos los árboles florecidos solo se hallaron dos diferentes tipos de flor: 77 árboles con flores pistiladas (hembra), algunos con escasas flores con estaminodios que se omitieron al consideras no funcionales, 29 árboles con solo flores estaminadas (macho), y 44 árboles con flores preferentemente estaminadas y con escasos frutos (monoicos) incipientes. En la prueba que se proporcionó no se hallaron diferencias significativas entre el número de árboles hembras, machos y monoicos combinados ($p= 0,8065$) ni tampoco en la proporción de hembras entre los sitios ($p = 0,6023$) (Figura 3).

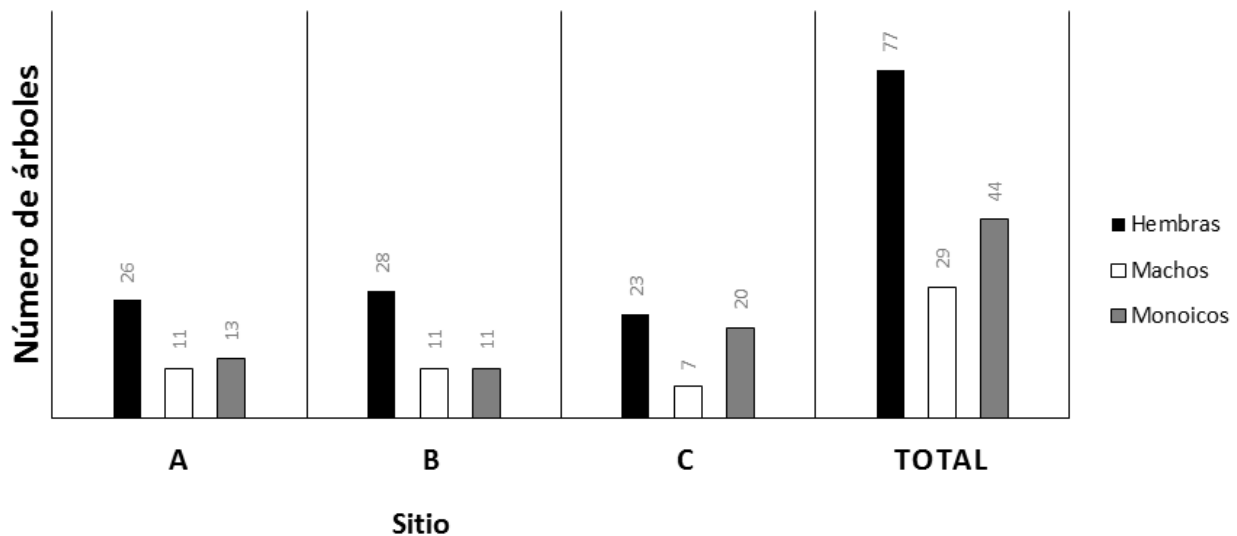


Figura 3. Número de árboles por sexo de *Bursera linanoe* en tres poblaciones naturales muestreadas y en total. (A=Mezquitlán, B=Comala I, C=Comala II).

El Diámetro normal promedio del total de árboles hembra fue 21.5 ± 2 cm, en árboles macho 20.9 ± 3.3 cm, y monoicos 26 ± 2.7 cm. Los árboles monoicos fueron 5 cm más grandes que los

árboles hembra y macho (Figura 4). Sin embargo, se hallaron también diferencias significativas en el diámetro normal (DN) entre sitios ($p=1.74e-11$) y entre sexos ($p=0.00084$) (Cuadro 1).

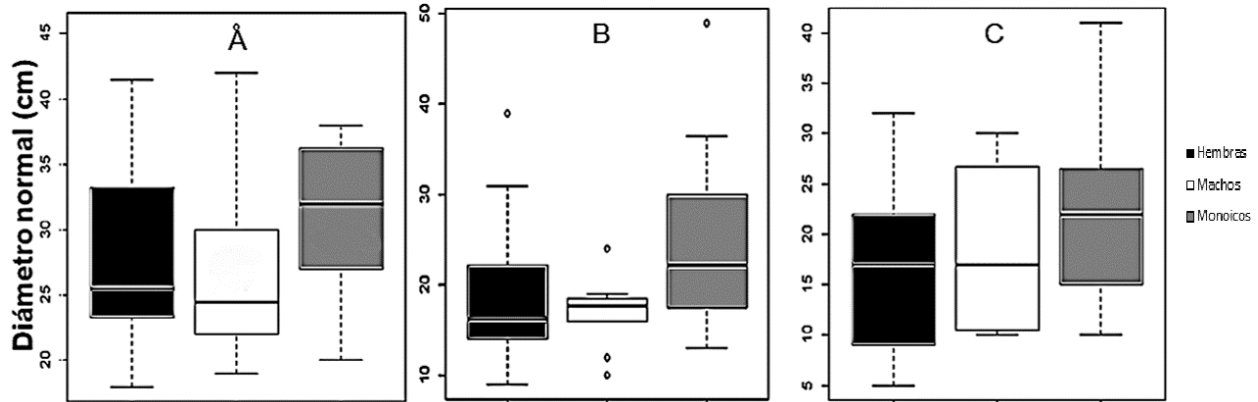


Figura 4. Comparación sexual del diámetro normal en 150 árboles de *Bursera linanoe* entre sitios muestreados. (A=Mezquitlán, B=Comala I, C=Comala II).

Cuadro 1. Análisis de varianza del DN de árboles de *Bursera linanoe* de acuerdo a sexo y sitio.

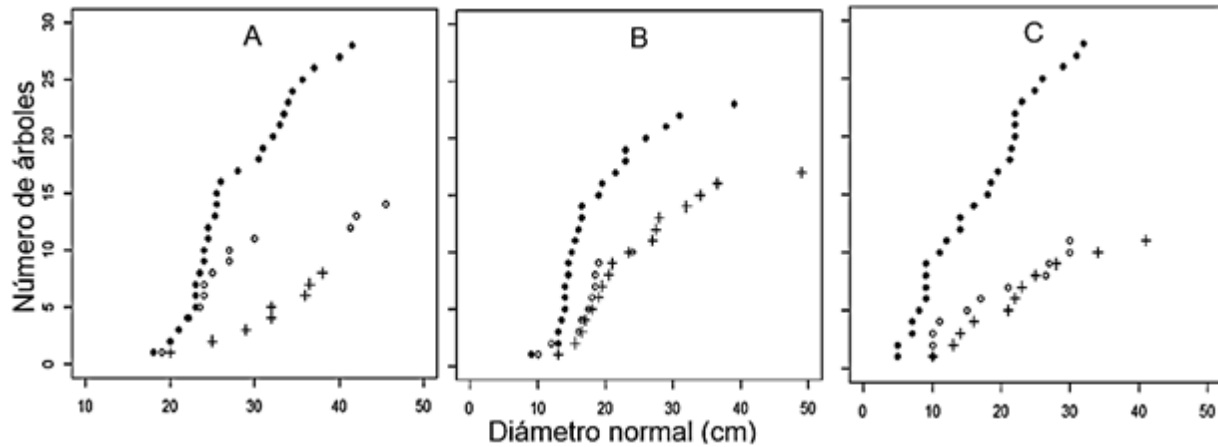
	Df	Suma Cuad.	Promedio Cuad.	F valor	Pr(>F)	Signif.
Sexo	2	835	417.7	7.44	0.00084	***
Sitio	2	3316	1658.1	29.53	1.74e-11	***
Residuales		145	8141	56.1		

El árbol de mayor DN es monoico y se halló en el sitio B (49 cm) mientras que el de menor DN es hembra y se halló en el sitio C (5 cm) por lo cual el monoico de mayor diámetro es 90% más grande que la hembra más pequeña.

La hembra de mayor DN se halló en el sitio B (39 cm), mientras la de menor diámetro se halló en el sitio C (5 cm). El macho de mayor DN se halló en el sitio A (40 cm), mientras que el más pequeño en los sitios B y C (10 cm). EL monoico de mayor DN se halló en el sitio B mientras que el de menor porte se halló en los sitios B y C (10 cm).

Los patrones de crecimiento diamétrico de 150 árboles analizados por tipo sexual mediante regresión lineal permiten observar que árboles dioicos (hembra y macho) se asemejan, sin

embargo, los árboles monoicos difieren a los dioicos en 5 cm ($p=0.0106$) (Figuras 4 y 5, Cuadro 2).



Los círculos rellenos (Hembras), círculos vacíos (Machos) y cruces (Monoicos). Sitios: A=Mezquitlán; B=Comala I; C=Comala II.

Figura 5. Distribución acumulativa del diámetro normal de árboles de *Bursera linanoe* muestreados en Guerrero.

Cuadro 2. Regresión lineal del DN por tipo sexual de 150 árboles de *Bursera linanoe*.

	Estimación	Error Std.	t valor	Pr(> t)	Signif.
Hembra	21,4792	1,0145	21,172	<2e-16	***
Monoico	4,3571	1,6824	2,59	0,0106	*
Macho	-0,5965	1,9396	-3,08	0,7589	

Significancia: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘.’ 1.

F= 4.056, p= 0.0193

4.5 Discusión

En las dos temporadas de floración se registró la observación de solo dos tipos predominantes de flores unisexuales (estaminadas y pistiladas) y frutos en tres arreglos sexuales (hembras, machos y monoicos) en las tres poblaciones estudiadas, sin embargo, los monoicos mostraron escasos frutos y no se sabe si la semilla es viable o funcional por lo cual no podemos descartar la posibilidad de flores con órganos sexuales atrofiados (estaminodios o gineceo vestigial)

(Rzedowski *et al.*, 2004) dentro de las tres poblaciones, el tamaño milimétrico de éstas pudo pasar desapercibido a la vista. A pesar de esto este tipo de flores pudieron ser muy reducidas en número o nulas, pero se podría sugerir un sistema sexual subdioico (Geber *et al.*, 1999; Yakimowski & Barrett, 2014) debido a la fructificación en los monoicos, lo cual contrasta con lo señalado por Rzedowski (2004) quien clasifica las poblaciones de cuencas altas del Papaloapan, Oaxaca, en dioicos o poligamodioicos.

Aunado a lo anterior, la proporción sexual encontrada en nuestro estudio fue similar entre sitios, donde fueron predominantes las hembras (~50%), seguidas de los monoicos (~30%), haciendo inconstantes a los machos (~20%), lo cual según Yakimowski & Barrett (2014) caracteriza a la subdioecia.

En nuestro estudio, árboles monoicos tienden a ser más grandes en diámetro que los dioicos (machos y hembras), de las tres poblaciones. En muchas especies de árboles dioicos, las hembras son más anchas en diámetro que los machos (Darwin, 1877; Lloyd & Webb, 1977; Charnov, 1982; Queenborough *et al.*, 2007). A pesar de esto en nuestro estudio, las hembras no fueron más anchas que los machos. A la fecha no se ha reportado alguna investigación similar que señale las diferencias en crecimiento diamétrico en función del sexo en especies forestales subdioicas. Cabe mencionar que la indiscriminada tala sexual pudo haber influido para que las hembras y machos permanecieran con diámetros similares.

Los resultados tienen implicaciones para conservación y manejo sustentable de esta especie con beneficios económicos, especialmente en los individuos monoicos, más aún, la dinámica poblacional se verá afectada por la proporción de sexos, pues si la frecuencia de hembras fuera baja, daría oportunidad a monoicos de ganar más aptitud mediante la inversión de óvulos (Yakimowski & Barrett, 2014).

Debido a esto la estabilidad de la población a largo plazo requiere una administración focalizada para producción de aceites esenciales, madera y resinas sin descuidar la presencia de machos y hembras lo suficientemente cerca para evitar afectar la transferencia de polen y de esta forma asegurar un mayor éxito reproductivo (House, 1992).

4.6 Conclusiones

1. Entre árboles dioicos los patrones de crecimiento no difirieron estadísticamente y al ser caducifolio solo se puede sexar en épocas de floración además que se debe confirmar durante la fructificación puesto que durante la época de secas se encuentran defoliados.
2. En los sitios muestreados de linaloe, se documentan únicamente flores unisexuales, flores estaminadas en árboles machos, flores pistiladas en árboles hembras, y suponemos que ambas flores unisexuales en árboles monoicos. Aunque previas sugerencias indican la presencia de individuos con flores hermafroditas o con órganos sexuales atrofiados.
2. De acuerdo con los datos registrados los árboles dioicos son de menor porte diamétrico que los árboles monoicos.
3. Las poblaciones de linaloe en Mezquitlán y Comala, en el estado de Guerrero demostraron a través de sus patrones de crecimiento diamétrico ser subdioicas.

4.7 Recomendaciones

De acuerdo a las conclusiones vertidas se recomienda

- a) Llevar a cabo una investigación de mayor precisión para definir si están presentes poblaciones poligamodioicas de linaloe en Guerrero, además de las poblaciones en Oaxaca.
- b) Los árboles monoicos se visualizan para producción de madera y resinas en plantaciones.

5. CAPITULO 2: PRODUCCIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN FRUTOS DE ÁRBOLES HEMBRA Y MONOICOS DE LINALOE (*Bursera linanoe*, Burseraceae) EN TRES RODALES NATURALES, EN EL ESTADO DE GUERRERO.

^aJuan Gutiérrez Santiago, ^bRamón Marcos Soto Hernández, ^aJesús Jasso Mata, ^cSimon Alexander Queenborough, ^aMarcos Jiménez Casas

^a Postgrado en Ciencias Forestales, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Texcoco Edo. México. C.P. 56230. Tel. +52 01(595)952-0200, ext. 1468. E-mail: jejama@colpos.mx

^b Postgrado en Botánica, Colegio de Postgraduados, Montecillo. msoto@colpos.mx

^c Yale School of Forestry & Environmental Studies, Yale University, New Haven, Ct, USA. E-mail: simon.queenborough@yale.edu

RESUMEN

Las plantas aromáticas son crecientemente demandadas en todo el mundo. La obtención del linalol a partir de árboles de linaloe ya era conocido antes del desarrollo del linalol sintético, sin embargo, el uso de aceites esenciales de especies de *Bursera* se conoce desde las culturas nativas Mexicanas. Poco se sabe acerca de la expresión sexual en *Bursera*, el manejo de la variación en la producción frutal y su contenido de aceites esenciales es información vital para un manejo sustentable en poblaciones subdioicas. Por lo cual se realiza una comparación por discriminación inter-sexual de árboles de linaloe para la producción de aceites esenciales a partir de los frutos maduros y frescos en tres sitios de muestreo en el estado de Guerrero. No se hallaron diferencias significativa en el rendimiento de aceites esenciales entre hembras y monoicos, sin embargo, las hembras son más contantes en la fructificación por lo cual atraen una mayor cosecha de frutos. Las plantaciones de lavanda india para una mayor producción de aceite esencial de origen frutal pudieran ser con árboles dioicos debido a que se maximiza la fructificación en hembras que no es posible sin la participación del polen de los machos o monoicos.

Palabras Clave: *Bursera*, aceites esenciales, polimorfismo sexual, linaloe, lavanda india

CHAPTER 2: FRUTAL ESSENTIAL OIL FROM FEMALE AND MONOECIOUS OF LINALOE TREES (*Bursera linanoe*, Burseraceae) IN THREE NATURAL STANDS IN GUERRERO STATE.

^aJuan Gutiérrez Santiago, ^bRamón Marcos Soto Hernández, ^aJesús Jasso Mata, ^cSimon Alexander Queenborough, ^aMarcos Jiménez Casas

^a Postgrado en Ciencias Forestales, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Texcoco Edo. México. Z.C. 56230. Tel. +52 01(595)952-0200, ext. 1468. E-mail: jejama@colpos.mx

^b Postgrado en Botánica, Colegio de Postgraduados, Montecillo. msoto@colpos.mx

^c Yale School of Forestry & Environmental Studies, Yale University, New Haven, Ct, USA. E-mail: simon.queenborough@yale.edu

ABSTRACT

Aromatics plants are increasingly demand worldwide. Obtaining linalool from linaloe trees was already known before development of synthetic linalool, however use of essential oils from *Bursera* species are known from native Mexican cultures. Little is known about sexual expression in *Bursera*, managing variation in fruit production and content of essential oils is vital information for sustainable management. A comparison by inter-sexual discrimination linaloe trees for the production of essential oils from fresh and ripe fruits in three sampling sites in Guerrero state are performed. No significant percentage of essential oils among females and monoecious trees was found, but females attract a greater harvest of these fruits. Indian lavender plantations for increased production of essential oil from fruit could be with dioecious trees because fruiting in female trees is maximize but is not possible without participation of pollen from male or monoecious trees.

Keywords: *Bursera*, essential oils, sexual polymorphism, linaloe, Indian lavender

5.1 Introducción

La extracción del linalol a partir de la madera de *Bursera linanoe* (linaloe) comenzó en el siglo XIX en Francia, Inglaterra y EEUU para la industria de perfumería fina. Sin embargo, el uso de aceites esenciales extraídos a partir de especies de *Bursera* nos remonta a las culturas nativas Mexicanas desde la antigüedad (Daly *et al.*, 2011; Fuentes-López *et al.*, 2011; Lucero-Gómez *et al.*, 2014; Peters *et al.*, 2003; Stacey, Cartwright, and McEwan, 2006). Para apoyar a la creciente industria perfumera, la tala indiscriminada disminuyó drásticamente el número de árboles de linaloe en México, especialmente en el sur de los estados de Morelos, Puebla y norte de Guerrero (Hersch-Martínez, 2004; Rzedowski *et al.*, 2004). Algunas plantaciones fueron desarrolladas en la India a principios del siglo XX, produciendo de 2-3 toneladas anuales, la mayoría destinada para perfumerías europeas, así como jabones, comida, bebidas y germicida. Fue también usado como un sustituto para el aceite de lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill. (Joy *et al.*, 2001)), de aquí el nombre de lavanda India.

La obtención del linalol a partir de linaloe ya era conocido antes del desarrollo del linalol sintético (Daly *et al.*, 2011), luego de haberse obtenido de manera sintética, las plantas aromáticas son crecientemente demandadas en todo el mundo (Wu & Chappell, 2008).

Sin embargo, los costos de producción han incrementado, dirigiendo la necesidad de fuentes de aceites esenciales a bajo costo mucho de lo cual se obtiene de los remansos de las poblaciones naturales (Chomchalow, 2002).

Debido a esto linaloe está siendo amenazado en su hábitat natural y se le está limitando a áreas cada vez más pequeñas, con una muy limitada habilidad de reclutamiento además de un porcentaje de germinación menor al 10% (Joy *et al.*, 2001).

La sobre explotación del fruto, combinado con la baja germinación, y la tala clandestina de grandes árboles fecundos que pudieran proveer un mayor potencial de reclutamiento, son factores que pudieran conducir a linaloe a incrementar el número de las pequeñas poblaciones y reducir drásticamente el ingreso monetario para las comunidades pobres que las usufructúan.

Los aceites esenciales se componen de terpenoides que son estructuralmente diversos y funcionan como fitoalexinas en defensa ecológica directa, o como señales en defensa indirecta (Cheng *et al.*, 2007).

Casi todas las partes de los árboles de linaloe, contienen terpenoides debido a su madera suave, sin embargo, varían en su concentración. Por ejemplo: el rendimiento de aceites esenciales obtenidos de las hojas es 0.15-0.25% la cantidad de rendimiento de aceites a partir de la cascara del fruto seco, la parte cosechada sustentablemente en India (Joy *et al.*, 2001; Hersch-Martínez, 2004) es mucho menor (1.8%) que la obtenida de la madera (2.5-3.0%). Los frutos frescos producen 1.5-2.5% de aceite y solo toma 5 horas su destilación, mientras que los frutos secos producen 12.8% pero esto toma 20 a 25 horas su destilación (Joy *et al.*, 2001).

El aceite del fruto es de un color brillante, líquido móvil, mucho más ligero que el agua de un peso específico (20 C) 0.8952, índice de refracción (20 C) 1.4658, rotación óptica (20 C) 1.5, índice de acidez cero, valor de saponificación de 130, índice de saponificación después de acetilación 274 y es soluble en etanol al 70%. La composición aproximada del aceite es metil heptanol 1.5%, 47.7% linalol, acetato de linalilo 40.8%, y otras sustancias viscosas 8%. El aceite mexicano contiene 60-75% de linalol. El aceite de hoja tiene un olor dulce y volátil que contiene 65-70% acetato de linalilo (Adams & Bhatnagar, 1975; Joy *et al.*, 2001).

Existen varias técnicas para extracción de aceites esenciales, las cuales difieren en sus características (Lahlou, 2004), sin embargo, la técnica de maceración por solvente orgánico, sostiene que al entrar un material sólido en contacto con un disolvente, los compuestos solubles en el material sólido se mueven al disolvente, por tanto, en esta extracción, aplicada a materiales vegetales ocurre la transferencia de masa del principio activo soluble al disolvente, debido a un gradiente de concentración. Aunque este proceso no es tan selectivo para aceites esenciales es una técnica de sencilla aplicación para la extracción de muchas muestras simultáneamente (Singh, 2008).

Para nuestro estudio se decidió proyectar un esquema preliminar de discriminación inter-sexual de árboles subdioicos para la producción de aceites esenciales a partir de los frutos maduros y frescos, excluyendo totalmente a los machos debido a que solo producen polen.

Poco se sabe acerca de la expresión sexual en *Bursera*, el manejo de la variación en la producción frutal y contenido de aceites esenciales es información vital para un manejo sustentable de estas poblaciones por lo cual se cuantifican, la fructificación y rendimiento de aceites esenciales de árboles de dos tipos sexuales de linaloe en tres sitios de muestreo en el estado de Guerrero, dejándonos direccionar la siguiente pregunta:

1- ¿Los sexos difieren en la cantidad de frutos y aceite esencial producido?

5.2 Objetivos

Explorar las diferencias intersexuales en la producción frutal y de aceites esenciales

5.2.1 Objetivos particulares:

- Cuantificar y comparar la producción frutal y el rendimiento de aceites esenciales por tipo sexual.

5.3 Métodos

5.3.1 Características de los sitios y marcado de arbolado

Se muestrearon tres sitios de linaloe en selva baja caducifolia de la vertiente del Rio Balsas, estado de Guerrero: Uno de los sitios (Sitio A) en el paraje “El calvario” Mezquitlán, Municipio de Copalillo (18° 01’17.30” N, 98°56’54” O), este lugar se encuentran perturbado debido a la cercanía de la población, extracción del fruto, madera y pastoreo. Dos sitios mejor conservados en Comala de Gómez, Municipio de Atenango del Rio (18°09’18.40”N, 99°04’05.47”O) en el paraje “Llano la herradura” a rivera del Rio Atenango (Sitio B) y en el paraje “La peña” (sitio C). Los tres sitios en laderas con disposición preferentemente este a una altitud entre 650 a 750 msnm, suelo muy pobre, pedregoso-arenoso en pendientes pronunciadas.

En 2014 y 2015, fueron marcados y enumerados con aerosol 150 árboles de linaloe, con ayuda de la clave de identificación de Rzedowski *et al.* (2004), dos guías miembros de la comunidad y por medio del aroma de las hojas, se tomaron al azar 50 árboles por sitio y se geoposicionaron con un (Gpsmap 76S garmin®).

5.3.2 Rasgos sexuales de las flores y sexado de árboles

Se observó el fenómeno de floración en rodales naturales en mayo con las primeras lluvias anuales de 2014 y 2015 para determinar el tipo de sexo en árboles de linaloe.

El sexado floral se realizó identificando cuidadosamente con ayuda de binoculares y un vernier, los órganos reproductivos, donde flores masculinas tetrámeras, lóbulos del cáliz triangulares, glanduloso-pubérulos y esparcidamente vilosos, pétalos blanquecinos, oblongos a oblanceolados,

glanduloso-pubérulos y vilosos por fuera, estambres 8, anteras oblongas de color amarillo cobrizo intenso muy vistosos, escasas flores con estaminodios, mientras que flores femeninas semejantes a las masculinas, estilo a veces con dos ramas libres casi hasta la base, estigmas 2 de color lechoso muy evidente y se observó el subsecuente desarrollo del fruto para verificar su sexo en agosto 2014 donde los pedúnculos fructíferos hasta de 4 cm de largo, pedicelos ligeramente engrosados, frutos hasta 8 por infrutescencia, pero no pocas veces solitarios, bivalvados, obovoides y a menudo atenuados en el ápice, pero algo comprimidos, glabros, rojizos en la madurez (Rzedowski *et al.*, 2004).

5.3.3 Cosecha de frutos

Durante agosto de 2014 los frutos maduros desarrollaron una mancha roja, por lo que se cosecharon en su totalidad los árboles identificados como hembras y monoicos, con ayuda de una garrocha y sacos de tela para mantener la integridad de los frutos frescos. Todos los frutos se pesaron y etiquetaron a pie de cada árbol. De cada lote de frutos por árbol se tomó una pequeña muestra (~50 g) en una bolsa plástica herméticamente cerrada que se mantuvo en una hielera y se trasladó a los laboratorios generales del postgrado en Botánica del Colegio de Postgraduados, Motecillo, Estado de México (19° 19'N, 98° 53' O, 2250 m) para la posterior extracción de aceites esenciales por muestra, el resto se recuperó para programas de producción de plántulas y extracción de aceites de las comunidades. Debido a la dehiscencia y la rápida oxidación de las bayas solo se pudieron cuantificar por completo los frutos por árbol de 5 monoicos y el número de frutos por kg de 2 monoicos y 23 hembras para así extrapolar con los datos de cosecha total en kg.

5.3.4 Extracción de aceites esenciales

La pequeña muestra tomada de frutos (~50 g) a partir de 84 árboles en agosto 2014 se refrigeraron a 4°C hasta septiembre de 2014 para evitar la degradación de los compuestos volátiles y así extraer adecuadamente de aceites esenciales, lo cual fue realizado por medio de un disolvente volátil (n-hexano), en el laboratorio general de Botánica del Colegio de Postgraduados. Cada muestra de fruto fue pesada en una balanza digital y fue macerada por 10 s

en un mortero cerámico, adhiriendo el solvente orgánico en la misma proporción en peso de muestra.

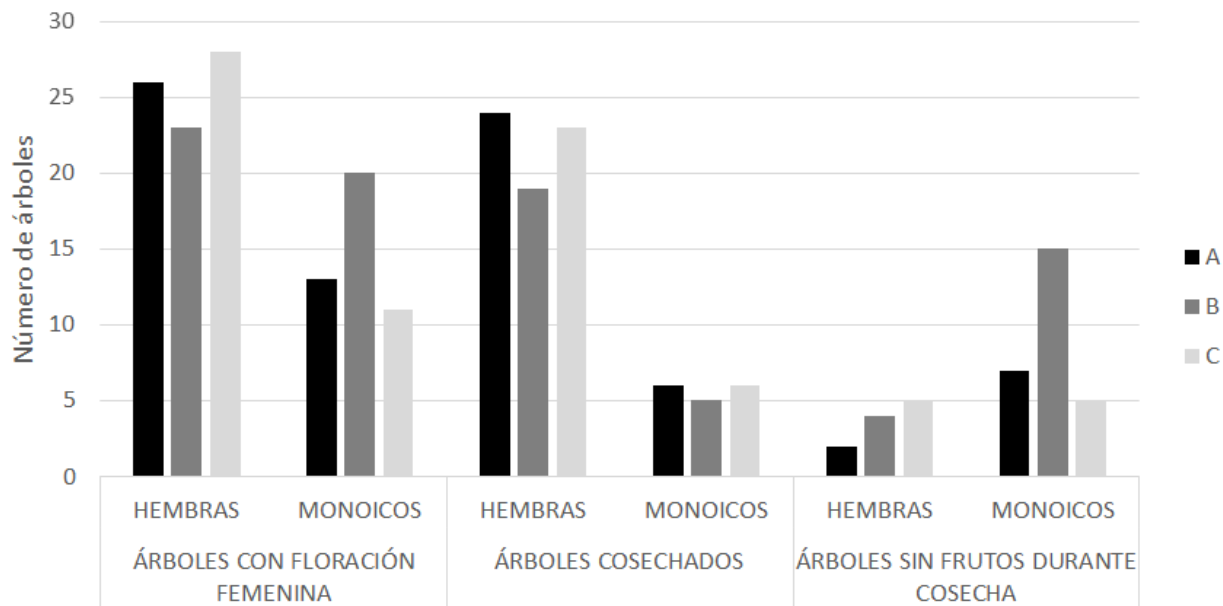
Las muestras fueron selladas en frascos de vidrio, se agitaron una vez al día durante cinco días. La matriz orgánica fue concentrada mediante un rota evaporador Büchi® con vacío a 40°C, hasta evaporar la mayor cantidad de disolvente posible y fue decantado a viales de 10 ml previamente pesados en escales de precisión con una pipeta Pasteur. Se dejó evaporar el resto del solvente a temperatura ambiente en una campana de extracción. Para obtener el rendimiento de aceites por kilogramo de fruto en cada árbol, se tomó el peso del aceite libre de solvente (g) de la pequeña muestra, y se dividió por el peso de muestra (g), para convertirlo a kg se dividió entre 1000 y luego fue multiplicado por 100 para obtener porcentaje.

5.3.5 Diseño experimental y análisis de resultados

Para nuestro análisis de datos se empleó un programa Excel y el paquete estadístico R en el que se realizaron análisis del peso, número total de frutos y por kg por árbol, además del rendimiento de aceite esencial individual para el que se comparan 30 muestras de árboles diferentes de dos sexos en tres sitios para análisis de varianza (hembras=15; monoicas=15).

5.4 Resultados

Durante el sexado de 150 árboles, 50 por sitio, se observaron 121 con flores femeninas y algunos con frutos incipientes (77 hembras y 44 monoicos), de los 121 finalmente solo 84 árboles produjeron frutos bien desarrollados (66 hembras y 18 monoicos) (Figura 6) debido posiblemente a diferentes razones como la inconstancia frutal o año semillero, no polinización, predación o herbivoría etc.



Cosecha 2014 (n =121) distribuidos por sitio (A) Mezquitlán, (B) Comala I y (C) Comala II.

Figura 6. Monitoreo de fructificación en árboles de *Bursera linanoe* por sexo en tres sitios.

De los 30 árboles que se les pudieron contabilizar el número de frutos, se halló a la hembra con mayor cantidad de frutos en el sitio C con 59,248 frutos, en el mismo sitio la hembra con menor cantidad de frutos con 347, lo que representa un 99.4% de diferencia productiva. En los árboles monoicos en el sitio B se halló el monoico con mayor cantidad de frutos 3,456, mientras que en el sitio A se halló el de menor número de frutos con apenas 2, lo que representa un 99.9% de diferencia productiva. La hembra más productiva es 84% más productiva que el monoico más productivo.

La varianza en el número de frutos entre las hembras fue mucho menor en comparación a los monoicos, lo que sugiere una mayor variabilidad de número de frutos entre árboles monoicos y una tendencia relativamente constante en la producción de frutos en hembras (Figura 7).

Quince árboles hembras no produjeron más peso en frutos que los quince árboles monoicos dentro de los tres sitios ($p=0.074$) (Cuadro 3, Figura 8).

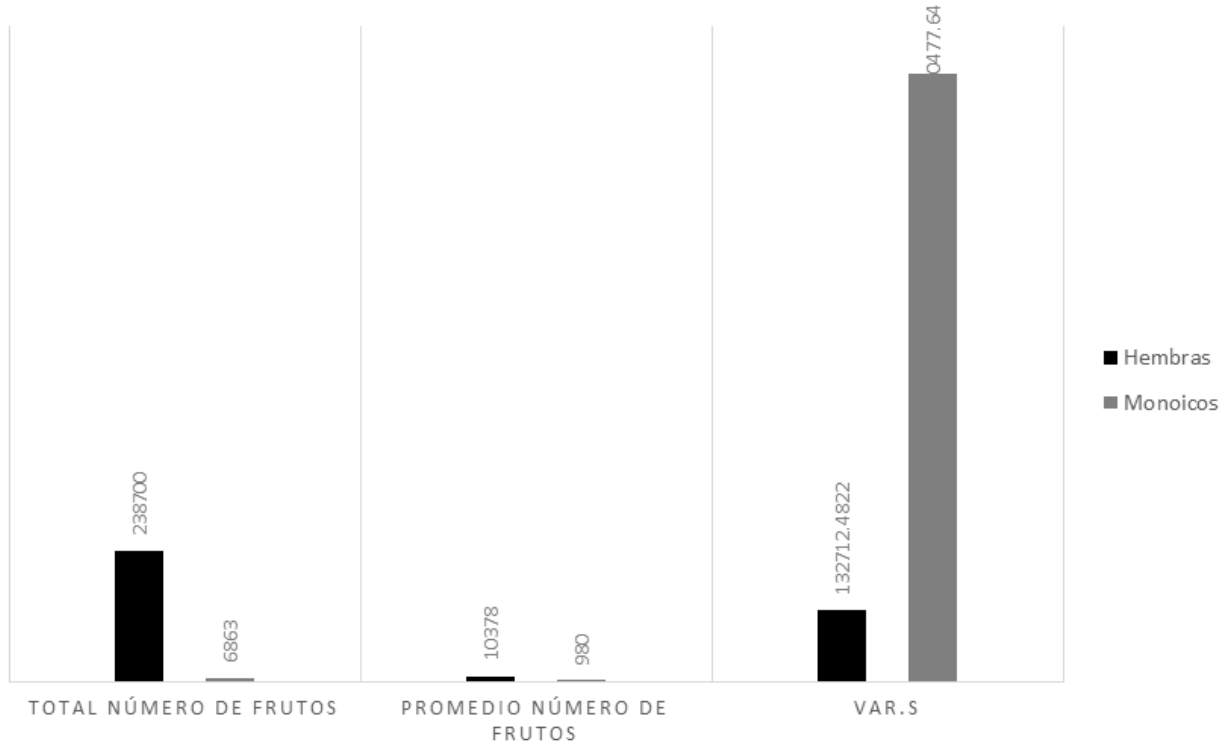


Figura 7. Varianza de muestra, número total y promedio de frutos bien desarrollados de árboles hembra y monoicos.

Cuadro 3. Análisis de varianza en peso de frutos de 30 árboles de linaloe.

	Df	Suma Cuad.	Promedio Cuad.	F valor	Pr(>F)	Signif.
Sexo	1	71.19	71.194	32.573	0.07478	.
Residuales	82		1792.26	21.857		

No se hallaron diferencias significativas en el rendimiento de aceites esenciales a partir de quince árboles hembras contra quince árboles monoicos dentro de los tres sitios ($p=0.9244$) (Cuadro 4, Figura 8).

Cuadro 4. Análisis de varianza en porcentaje de aceites esenciales de 30 árboles

	Df	Suma Cuad.	Promedio Cuad.	F valor	Pr(>F)	Signif.
Sexo	1	0.013	0.01277	0.0091	0.9244	
Residuales	82		115.610	140.987		

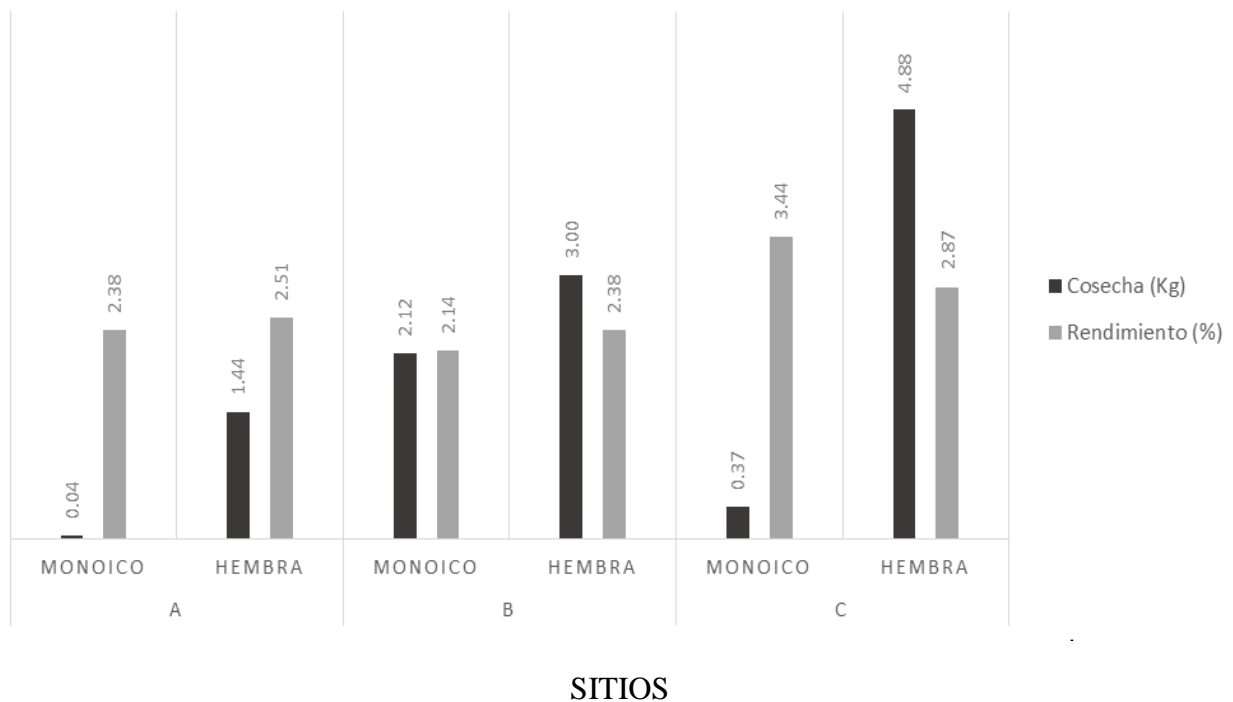


Figura 8. Comparación de la producción frutal y rendimiento de aceites esenciales de 84 árboles en tres sitios de muestreo.

5.5 Discusión

Teóricamente los árboles hembra son por definición aquellos que desarrollan frutos y no polen. Los machos, son aquellos que producen polen y no frutos, sin embargo, la presente complejidad subdioica hallada en los tres sitios de muestreo nos lleva a diferenciar a tres tipos sexuales (hembras, machos y monoicos), sin embargo, se discrimina a los árboles macho para evaluar los frutos a pesar de que se sabe que en otras poblaciones exista un hermafroditismo floral como en

poblaciones del Estado de Oaxaca (Rzedowski *et al.*, 2004) y así acercarnos al comportamiento de la fructificación y la implicación en producción de aceites esenciales a partir del fruto.

Hasta ahora no se había cuantificado y comparado la fructificación en casos de subdioicismo en estos árboles tropicales, la producción frutal en este caso depende del sexo y los recursos ecológicos disponibles, así como el polen disponible de los machos y monoicos (Pérez *et al.*, 2003). En este análisis se halló que las hembras siempre producen mayor número de frutos, siendo hasta 84% más productiva que el monoico más productivo.

Los aceites esenciales son fitoalexinas de defensa directa o indirecta (Cheng *et al.*, 2007) su producción limita crecimiento y reproducción (Neilson *et al.*, 2013; Kliebenstein, 2014).

Según Joy *et al.* (2001) los frutos frescos producen 1.5-2.5% de aceites esenciales lo cual coincidió cercanamente en nuestro estudio con la extracción mediante solvente orgánico. Además es necesario descartar las diferencias en rendimiento de aceites esenciales entre sexos, pues en nuestro estudio no se halla significancia en porcentaje de aceites esenciales, sin embargo, las hembras siempre generan mayor cantidad de frutos por árbol.

Un peligro a largo plazo en la sustentabilidad de una población viene si un sexo es etiquetado como preferente para la cosecha de fruto o derribo, la sobre extracción de estos individuos podrían tener profundas implicaciones para su regeneración a largo plazo y existe un peligro de efecto alélico si el tamaño de la población llega a ser muy reducido (House, 1992) como en poblaciones de *Bursera* (Rzedowski *et al.*, 2004).

La intensa extracción de frutos ha demostrado interrumpir la regeneración, y altera la estructura de la población y dramáticamente altera los porcentajes de crecimiento de las poblaciones (Peres *et al.*, 2003), por lo que debería evitarse en lo posible el abuso para así asegurar una producción de aceites esenciales en forma sustentable.

Debido a ello para la estabilidad de la población a largo plazo se requiere una mayor densidad para que la presencia de machos y hembras estén suficientemente cerca para incrementar la transferencia de polen. Una posible solución a la intensa cosecha de frutos, sería plantar mayor cantidad de árboles macho o aplicar la polinización asistida que pudieran proveer suficiente fruto para satisfacer la demanda e incrementar en algo de regeneración.

5.6 Conclusión

1. Aunque el peso en frutos por árbol fue estadísticamente marginal en árboles hembra y el porcentaje de aceites esenciales a partir del fruto es similar entre hembras y monoicos, las hembras siempre producen mayor número de frutos.

5.7 Recomendaciones.

Para las plantaciones de lavanda india con una mayor producción de aceite esencial de origen frutal pudieran ser con árboles dioicos ya que estos árboles están especializados en la producción exclusiva de polen (macho) y óvulos (hembra) maximizando así la producción anual.

El polimorfismo sexual de linaloe pudiera explicar una compensación metabólica, debido a que en el capítulo uno de esta tesis se comparan patrones de crecimiento diamétrico, lo cual resultó, que en árboles monoicos exista una tendencia de mayor de crecimiento, lo que se supone, sea debido a la distribución de sexos a nivel floral, pues se observa el desarrollo de bajo número de flores femeninas y menor desgaste energético para asegurar la reproducción (producción de aceites en frutos) que difiere con los árboles dioicos que se especializan exclusivamente a la producción de polen y óvulos en diferentes individuos.

6. CAPITULO 3: ESTABLECIMIENTO *in vitro* DE EXPLANTES VEGETATIVOS DE LINALOE (*Bursera linanoe*, Burseraceae).

^aJuan Gutiérrez Santiago, ^bCarlos Román Castillo Martínez ^aJesús Jasso Mata, ^aMarcos Jiménez Casas

^a Postgrado en Ciencias Forestales, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Texcoco Edo. México. Z.C. 56230. Tel. +52 01(595)952-0200, ext. 1468. E-mail: jejama@colpos.mx

^b CENID-COMEF, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Coyoacán, México, D.F. castillo.carlos@inifap.gob.mx

RESUMEN

Muchos son los factores que han contribuido a la reciente popularidad de sabores y fragancias naturales derivados de las plantas aromáticas, lo cual motiva a las industrias a usar materia prima natural a un precio mucho mayor. Los métodos de propagación vegetativa en árboles aromáticos apoyan programas de desarrollo forestal y evitan la desaparición de la especie, en menor tiempo y de constitución genética deseada, para producción comercial. Linaloe es un árbol aromático endémico que tiene gran potencial comercial en el mundo, por lo cual se documenta una metodología de propagación de explantes *in vitro*. Se empleó una accesión de 12 genotipos a partir de plantas de linaloe, menores de 4 años, sin identificar sexo, procedentes del estado de Guerrero. Se utilizó el Medio de cultivo básico MS (1962) y WPM (1980), adicionados con PPM y carbón activado. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de ambiente controlado a temperatura 28°C durante el día y de 22 a 24°C durante la noche. Se establecieron en un arreglo de 18 tratamientos y una distribución completamente al azar para cada clon, con 15 repeticiones para un total de 270 unidades experimentales para cada medio de cultivo. Los medios de sales empleados mostraron varianzas muy significativa en ambas y los tratamientos hormonales una variabilidad marginalmente significativa, en el ANOVA los tipos de medio mostraron mayor significancia en número de rebrotes observados que en los 18 tratamientos empleados. A los 30 días de evaluación el mejor resultado en número de brotes por comparación de Medias de Tukey ($\alpha=0.05$) por explante fue el tratamiento 11 del Medio WPM suplementado con BA 0.5 mg/L+ANA 0.05 mg/L.

Palabras clave: Burseraceae, linaloe, *in vitro*, lavanda india, WPM

CAPITULO 3: ESTABLISHMENT *in vitro* OF VEGETATIVE EXPLANTS FROM INDIAN LAVENDER (*Bursera linanoe*, Burseraceae).

^aJuan Gutiérrez Santiago, ^bCarlos Román Castillo Martínez ^aJesús Jasso Mata, ^aMarcos Jiménez Casas

^a Postgrado en Ciencias Forestales, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Texcoco Edo. México. Z.C. 56230. Tel. +52 01(595)952-0200, ext. 1468. E-mail: jejama@colpos.mx

^b CENID-COMEF, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Coyoacán, México, D.F. castillo.carlos@inifap.gob.mx

ABSTRACT

Many factors have contributed to growing popularity of natural flavors and fragrances derived from herbs, which encourages industries to use natural material at much higher price. Methods of vegetative propagation from aromatic trees, support forestry development programs and prevent disappearance species, at short time and genetic characteristics desired, maintaining purity for commercial production. Linaloe is an endemic aromatic tree that has great commercial potential worldwide, thus spreading methodology is documented explants *in vitro*. An accession of 12 genotypes was used from linaloe plants, fewer than 4 years, no sex identify, from Guerrero state. Basic culture medium MS (1962) and WPM (1980), were supplemented with PPM and charcoal was used. Cultures were maintained in a controlled environment chamber at 28 ° C temperature during the day and from 22 to 24 ° C overnight. They settled in a settlement of 18 treatments and a fully randomized for each clone, with 15 repetitions for a total of 270 experimental units for each medium. Media salts employed, showed significant variances in both hormonal treatments and a marginally significant variability in ANOVA media types showed higher significance in shoots number observed in 18 treatments used. A thirty day trial, the best result in shoots number by Tukey ($\alpha = 0.05$) comparison per explant was treating 11 WPM Medium supplemented with BA 0.5 mg / L + ANA 0.05 mg / L.

Key words: burseraceae, linaloe, *in vitro*, indian lavender, WPM

6.1 Introducción

Las plantas y árboles aromáticos tienden a una creciente popularidad a nivel global (Joy *et al.*, 2001; Chomchalow, 2002) debido a factores que aquejan actualmente a la población humana, por lo que recursos forestales en bosques nativos son cada vez más demandados, en particular las plantas y árboles aromáticos, por lo cual se busca:

- Salud consciente: ciertamente los sabores y compuestos fragantes sintéticos usados en varias industrias han sido conocidas por representar un seguro riesgo a la salud. Por lo tanto estas industrias son forzadas a usar materia prima natural a un precio mucho mayor que los compuestos sintéticos (Chomchalow, 2002).

A pesar de las altas demandadas de productos naturales a partir de las plantas aromáticas, los costos de producción son cada vez más elevados, por tal motivo es necesario buscar otras alternativas más económicas.

En Asia los árboles cultivados con fines aromáticos, son seleccionados de rodales naturales para propiciar variedades mejoradas, sin embargo, especies introducidas como linaloe, se eligen cuando demuestran una producción económicamente viable después de investigaciones con respecto a su adaptación, procesos técnicos simples, y con mercados asegurados (Swetha, 2005).

Los métodos de propagación vegetativa están siendo ampliamente usados para multiplicar árboles de constitución genética deseada, y manteniendo su pureza para producción comercial más efectiva.

Linaloe es propagado sexual (por semilla) y asexualmente (por micro o macro propágulos), de estos métodos se han hallado más exitosos los asexuales (Hernández-Vásquez *et al.*, 2013; Castellanos & Bonfil 2010; Bonfil-Sanders *et al.*, 2007).

Muchas de las especies con potencial comercial son difíciles de enraizar, lo cual se lleva a cabo con diversas técnicas de propagación vegetativa con ayuda de inducción de hormonas, riego nebulizado e inoculación de hongos micorrízicos, etc., (Swetha, 2005; Díaz-Castro, 2009).

La premisa expuesta en el título de este capítulo se enfoca a la búsqueda de métodos vegetativos de reproducción masiva y conservación, de esta forma se busca apoyar programas de desarrollo forestal y evitar la desaparición de la especie en su área de distribución natural, menguando la fuerte presión y eludir dificultades para reproducción de forma natural.

6.1.1 Macro propagación:

En la literatura concerniente al estacado, Castellanos-Castro y Bonfil-Sanders (2010) evaluaron el crecimiento y la supervivencia de estacas juveniles enraizadas de tres especies de *Bursera* (*B. linanoe*, *B. glabrifolia* y *B. copallifera*) en sitios con diferentes características del suelo. Obteniendo estacas de cinco árboles por cada especie, reportando a *Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón & Medina (linaloe) con el valor más alto (77.5%) de respuesta, además que sólo en esta especie se detectaron incrementos en diámetro y la altura de estacas.

Otra investigación realizada por Díaz-Castro en 2009 probó con estacas de linaloe obtenidas de diferentes localidades de la cuenca del Alto Balsas en el estado de Puebla y Guerrero. Los estudios revelaron que el grosor de las estacas influye directamente sobre la velocidad de brotación; sin embargo, las estacas delgadas (1-2 cm) en posición apical en la rama tienen una velocidad de brotación mayor que las medianas y gruesas. Ninguno de los promotores utilizados en el ensayo de propagación por estacas tiene efectos significativos sobre la brotación, debido a que las estacas de linaloe producen suficiente axina endógena; sin embargo, la aplicación de micorrizas promueve un mayor volumen radical. Además el aumento de las temperaturas mínimas influye en la activación de las yemas de letargo. La precipitación es un factor importante para el crecimiento vegetativo y la floración.

En la India, Swetha (2005) reporta la propagación por estacas de linaloe con influencia de reguladores del crecimiento y medios de enraizamiento bajo un sistema de nebulización, durante 2004-2005. Los estudios revelaron que las plantas de linaloe podrían multiplicarse fácilmente por el tratamiento previo de estacas con AIB, 2000 ppm y la siembra en arena o turba de coco o suelo + arena, colocándolas bajo una cámara de nebulización. De esta forma, se podrá obtener el volumen más alto de material de siembra con bastante facilidad.

6.1.2 Micro propagación:

Dentro de la Familia Burseraceae uno de los estudios más completos sobre propagación *in vitro* fue realizado por Kant *et al.* (2010) quienes evaluaron en la India a la especie *Commiphora wightii* (Arn.) Bhandari, la cual es una especie medicinal conocida por su principio activo gugulesterona E y Z, que se utilizan en medicamentos para bajar el nivel de colesterol en cuerpo humano.

Debido a su sobreexplotación y que su regeneración natural es muy pobre, se encuentra al borde de extinción y en lista Roja de la UICN (International Union for Conservation of Nature). En el estudio se reporta el desarrollo de un protocolo de micropropagación a partir de nudos cotiledonares, estos se utilizaron como explantes y micro tallos múltiples que se obtuvieron de un medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con 2,68 mM de ácido α -naftaleno acético (ANA) y 4,44/M de 6 benzylaminopurina (BAP) y en 2,68 NAA / M; 4,44 mM BAP con aditivos (glutamina 684,2 M; tiamina 29.65/M, carbón activado 0,3%) y diversas combinaciones hormonales. Un alargamiento significativo de micro tallos se observó con el ácido 2,46/M indol-3-butírico (IBA) y 2.22 mM BAP complementado medio MS. Sin embargo, el enraizamiento más eficiente se observó en micro tallos pre tratados con 4,92 mM de IBA durante 24 horas, seguido por la transferencia a un medio blanco sin reguladores de crecimiento vegetal (PGR) y alta concentración de carbón activado (CA).

Los micro brotes obtenidos a partir de este método fueron transferidos a vermiculita y humedecidos con solución de Hoagland para endurecimiento primario durante 4-5 semanas y, finalmente, se transfirieron a vasos de plástico con vermiculita, colocados en la cámara de niebla, pasadas luego a suelo, y después a un invernadero para aclimatación completa y finalmente trasplantados al campo experimental.

En la India desarrollaron un protocolo de micropropagación *in vitro* a partir de nudos cotiledonares de *Boswellia ovalifoliata* de la familia Burseraceae, empleando un medio MS modificado, realizando una comparación de 6-benziladedina, cinetina y thidiazuron con ácido 1-nafatalen acético. La mayor respuesta de multiplicación se observó en 50 d en MS suplementado con thidiazuron (2.72 μ M) (Chandrasekhar *et al.*, 2005).

En México Díaz-Castro (2009) logró avanzar hasta la etapa de multiplicación en el establecimiento de la técnica de cultivo *in-vitro* de linaloe. Las concentraciones de 0.3 mg L⁻¹ de 2-4-D y 0,1 mg L⁻¹ de BA inducen la formación de embriones somáticos, mientras que concentraciones mayores a 0,1 mg L⁻¹ solo inducen callo, pero con necrosamiento.

En nuestro país también se planteó mejorar la metodología de embriogénesis somática tradicional mediante un sistema de inmersión temporal para linaloe, asimismo, evidenciar el proceso embriogénico indirecto y secundario, dicho autor utilizó la línea embriogénica LEL 61-4, y un medio de cultivo base MS complementado con 30 g L⁻¹ sacarosa, 0.022 μ m BA y 0.027

µm ANA, con temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo de 16 h, provista por diodos emisores de luz azul, blanca y roja. Inicialmente los resultados respecto al uso de los tipos de luz y los sistemas de cultivo lograron generar un incremento significativo en biomasa (Vázquez-Cisneros, 2014).

6.2 Objetivo

Realizar el establecimiento *in vitro* de la especie *Bursera linanoe*.

6.2.1 Objetivos particulares:

Obtención de un protocolo adecuado para el establecimiento *in vitro* de linaloe.

6.3 Métodos:

Este capítulo se llevó a cabo en el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en el laboratorio Agrícola-Forestal; sección: Conservación *in vitro* y Criopreservación de especies vegetales de semilla recalcitrante.

6.4 Establecimiento *in vitro* de linaloe.

Se empleó una accesión de 12 genotipos a partir de plantas de linaloe, menores de 4 años, sin identificar sexo, procedentes de Atenango del Rio Guerrero, los cuales fueron aclimatados a condiciones de invernadero y del huerto semillero del CP montecillo ($19^{\circ} 19' \text{N}$, $98^{\circ} 53' \text{O}$, 2250 m) durante año y medio, fueron fertilizados con 16N-16P-16K mensualmente y riegos periódicos cada tres días.

Estos ejemplares fueron transportados al CNRG y aclimatados por tres semanas en condiciones de invernadero (1,800 msnm), regados cada dos días, luego pre tratados aplicando con una aspersor AGRI-MYCIN®100 1mg L-1 y Captan®50ph 4 mg L-1 semanalmente, antes de la obtención de explantes para el procedimiento *in vitro*.

6.5 Preparación de medios de cultivo

Se emplearon el Medio de cultivo básico Murashige & Skoog (MS, 1962) y Woody Plant Medium (WPM, 1980), para control de la oxidación de los explantes se adicionó al medio de cultivo PPM™ (100 mg l-1), carbón activado (CA, 100 mg l-1) y Polivinilpirrolidona (PVP, 40 mg l-1).

Las sales de cada medio se vertieron en una probeta graduada de 2L con agua bidestilada en constante agitación incorporándose los compuestos previamente pesados y después fueron aforados.

En la probeta graduada fueron adheridos 1,125 ml de cada medio (MS y WPM). Luego se realizaron las particiones para 18 tratamientos en vasos de precipitados (Cuadro 5).

Una vez etiquetado cada vaso de precipitado fueron adicionadas la concentración hormonal acorde a cada tratamiento en constante agitación. Se midió el pH con un potenciómetro y se ajustó a 5.7 con hidróxido de sodio (NaOH) a 1.0 N y 0.1 N y ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 0.1N y después e agregó agar (2gr) por cada tratamiento en constante agitación.

El medio de cultivo fue calentado en un microondas y se vació en un dispensador, luego fue distribuido colocando 5 ml en cada tubo de vidrio de 75x25 mm previamente estériles.

Cuadro 5. Número de tratamientos y el stock hormonal suplementado.

TRATAMIENTOS		SUPLEMENTO HORMONAL	
MS	WPM	BENCILAMINOPURINA (BA) mg/L	ACIDO NAFTALACETICO (ANA) mg/L
1	10	0	0
2	11	0.5	0.05
3	12	0.8	0.08
4	13	1	0.1
5	14	2	0.2
		CINETINA (KIN) mg/L	ACIDO INDOLACETICO (AIA) mg/L
6	15	0.5	0.05
7	16	0.8	0.08
8	17	1	0.1
9	18	2	0.2

Los frascos se taparon y se colocaron en una canastilla para su esterilización, la cual se hizo en un autoclave Yamato Scientific® a 1.5 kg/cm² de presión a una temperatura de 121°C por 17 minutos. Los medios de cultivo se dejaron solidificar a temperatura ambiente, en gradillas, inclinándolas y conservándolas a 45°C para evitar la acumulación de humedad lo que puede

ocasionar la contaminación del medio, hasta gelificar. Los tubos de ensaye fueron rotulados en cada tratamiento para su identificación.

6.6 Tren de desinfección del material vegetal.

En el área de preparación del medio del laboratorio *in vitro*:

Se disectó el material vegetal con tijeras previamente desinfectadas con toallas húmedas de hipoclorito de sodio, luego se sumergieron en una solución con detergente comercial para iniciar su desinfección. La desinfección se llevó a cabo lavando y cepillando con detergente Roma® varias veces los ápices y secciones de tallo con yemas axilares y enjuagando dos veces con agua corriente y una con agua bidestilada. Los explantes pasaron por una inmersión en una solución de Captan®50ph 4 mg L⁻¹ y removidos durante 60 minutos se enjuagaron tres veces con agua bidestilada. Los explantes pasaron por una inmersión en una solución de etanol al 70% durante 2 minutos y enjuagados tres veces con agua bidestilada y trasladada en vasos de precipitados a la campana de flujo laminar. Una vez en la campana de flujo se procedió a sumergir los explantes durante 17 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 30% y enjuagados tres veces con agua estéril y se mantuvieron en cajas Petri tapadas hasta el momento de la siembra.

6.7 Siembra *in vitro*

Se preparó el área de siembra, limpiando la campana de flujo laminar con etanol al 70 % e irradiando con luz UV por 25 min, posteriormente se flameó el material para disección (bisturíes, pinzas y cajas Petri) y se colocaron en el Germinator® por 15 segundos, se dejaron enfriar en una base ya estéril. Bajo condiciones una vez asépticas, los explantes desinfectados se disectaron superficialmente en segmentos de 1 a 1.5 cm de longitud, conservando de 1 a 2 yemas axilares cada uno. Se sembró un explante en cada tubo de ensaye, en cada tratamiento se emplearon 15 repeticiones, estos se taparon con tapones de polipropileno y se sellaron con parafilm o vitafilm.

6.8 Condiciones de incubación

Durante todo el experimento los cultivos se mantuvieron en una cámara de ambiente controlado a temperatura 28°C durante el día y de 22 a 24°C durante la noche. La iluminación se proporcionó con lámparas fluorescentes DURO-TEST (LabLine) de 75 W ajustándose a un fotoperiodo de 16 horas luz (con una intensidad luminosa de 2700-3200 lux) y 8 horas de oscuridad. Los tratamientos se evaluaron cada 10 días.

6.9 Diseño Experimental y análisis estadístico.

Los experimentos para el establecimiento de los cultivos asépticos se establecieron en un arreglo de 18 tratamientos y una distribución completamente al azar para cada clon, con 15 repeticiones para un total de 270 unidades experimentales para cada medio de cultivo. El material obtenido sin contaminación a los 25 días del establecimiento aséptico se trasplantó a un nuevo medio de cultivo para la inducción de brotes y callos. Se empleó el medio WPM con el mismo stock hormonal arriba mencionado con excepción del PPM™ y ajustado a un pH de 5.7.

En este experimento las variables a evaluar fueron: contaminación (C), porcentaje de oxidación (O) (Figura 9), presencia de callos (CA) y número de brotes (B) en cada explante.

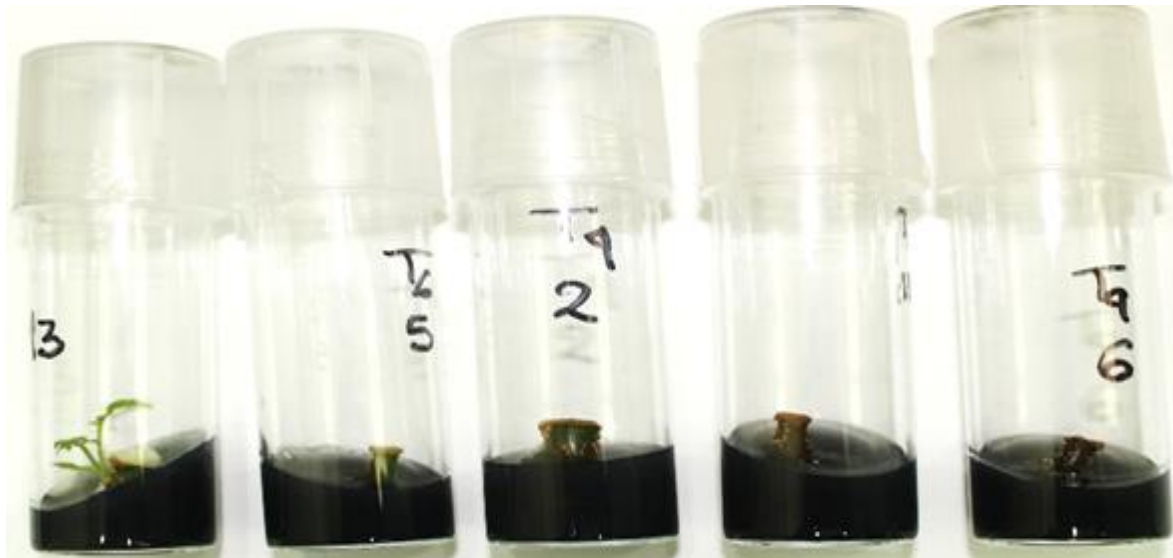


Figura 9. Evaluación de niveles de oxidación. Escala de observación de porcentaje de oxidación en los explantes (de izquierda a derecha; 0, 25, 50, 75 y 100%)

6.10 Resultados

Día 10: En el décimo día se observaron 21.18% de contaminación debido a hongos y un 1.19% de bacterias en todo el experimento.

Día 20: Durante el vigésimo día se observó un promedio de 25% de contaminación debido a hongos y un 2.37% de bacterias, el 75% de explantes asépticos, de los cuales 46% sanos, 41% con presencia de callo y 28% de oxidación, a su vez un 11% de brotes, en todo el experimento, se presentan a continuación las mejores respuestas por tratamiento (Figura 10).

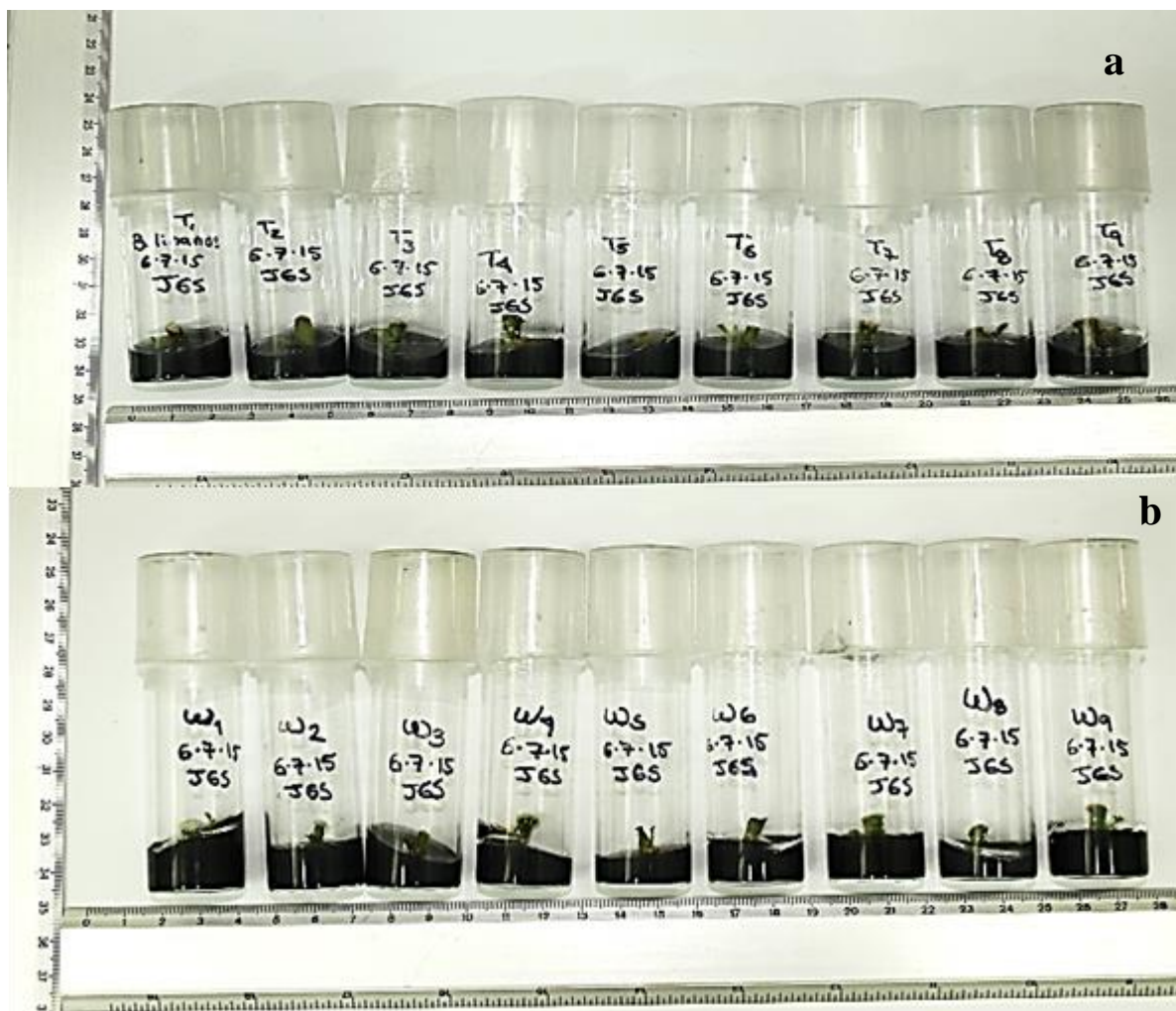


Figura 10. Mejor explante por tratamiento en el día 20 (a=MS, b=WPM).

Día 30: Durante el trigésimo día se observó un promedio de 30.37% de contaminación, el 70% de explantes asépticos, de los cuales 17% sanos, 46% con presencia de callo y 52% de oxidación a su vez un 12.2% de brotes, en todo el experimento (Cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados obtenidos en la evaluación del día 30.

Tratamientos en MS			Tratamientos en WPM		
Conteo		%	Conteo		%
42	Contaminados	31.11	40	Contaminados	29.63
135	Limpios	68.89	135	Limpios	70.37
	Oxidados	58.42		Oxidados	46.06
	Sanos	10.47		Sanos	24.31
53	Callos	39.26	71	Callos	52.59
10	Brotos	7.41	23	Brotos	17.04

Se realizó un ANOVA (Cuadro7) para evidenciar diferencias significativas entre medios usados y tratamientos de suplementos hormonales, de los cuales resultó haber mayor significancia entre medios que entre tratamientos.

Cuadro 7. Análisis de varianza de brotes en relación medios + tratamientos.

	Df	Suma Cuad.	Promedio Cuad.	F valor	Pr(>F)	Signif.
Medios	1	0.6940	0.69397	4.5634	0.03388	*
Tratamiento	1	0.5267	0.52672	3.4636	0.06420	.
Residuales		200	30.4148	0.15207		

También se realizó una prueba de medias de Tukey ($\alpha=0.05$) entre tratamientos, a pesar de no haber diferencia estadística entre ellos.

Aunque en los tratamientos hormonales se halló una significancia marginal durante treinta días, se muestran los mejores resultados en cada tratamiento (Figura 11) donde se puede apreciar de izquierda a derecha el explante con mejor respuesta por tratamiento.

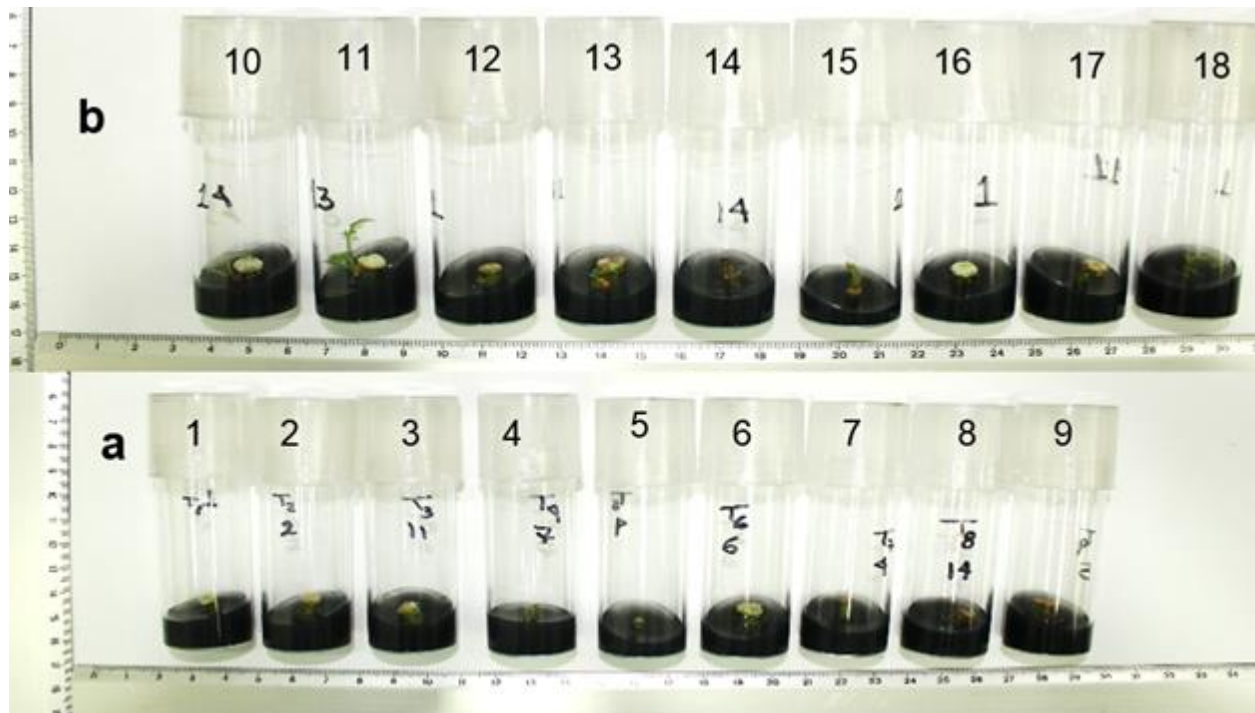


Figura 11. Explantes con mejor respuesta por tratamiento (a=MS, b=WPM), en el día 30.

6.11 Discusión

Aunque la duración del experimento fue muy corto (30 días), los medios de sales empleados y adicionados con carbón activado (100 mg l^{-1}) y Polivinilpirrolidona (40 mg l^{-1}) mostraron mayor significancia en el número de rebrotes observados, que en los 18 tratamientos hormonales empleados. Existe una diferencia de concentración de sales en los medios, pues WPM (1980) es indicado para especies leñosas mientras que el medio MS (1962) para plantas de rápido crecimiento.

En los tratamientos empleados al no ser significativos, se tomó en cuenta como mejor respuesta en número de brotes por explante, el tratamiento más cercano a α , de esta forma evidenciamos explantes del tratamiento 11 del medio WPM+ CA (1 mg/L)+ PVP (1 mg/L) suplementado con BA (0.5 mg/L)+ ANA (0.05 mg/L) (Figura 12). Para reforzar el supuesto, se ha observado en la bibliografía que las estacas de linaloe producen suficiente auxina endógena (Díaz-Castro, 2009), la formulación de BA (2000 ppm) ayuda a mejorar la inducción de raíces contra un testigo (Swetha, 2005) y en micro estacas de *Commiphora wightii* (Burseraceae) pre tratadas con $4,92 \text{ mM}$ de BA durante 24 horas, seguido por la transferencia a un medio blanco sin reguladores de

crecimiento vegetal y alta concentración de carbón activado se obtiene un mayor resultado de enraizamiento y brotación (Kant *et al.*, 2010)



Figura 12. Ejemplo de las mejores respuestas observadas en 15 explantes del tratamiento 11 (WPM).

6.12 Conclusión

A los treinta días de evaluación de explantes a partir de plantas de linaloe, se observó que de 15 explantes por tratamiento, el explante 13 del tratamiento 11 del medio WPM+ CA (1mg/L)+ PVP (1mg/L), suplementado con BA (0.5 mg/L)+ANA (0.05 mg/L), como el de mejor respuesta, que si no significativa ($\alpha=0.2$), la más cercana a $\alpha=0.05$ por comparación de Medias de Tukey.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D.R., and S.P. Bhatnagar. 1975. "Analysis of the Volatile Constitutens of Essential Oil of Indian Linaloe." *Indian Flavours Food Addit.* 6 (3): 185–88. <http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201002039954362716>.
- Becerra, Judith X., and Koji Noge. 2010. "The Mexican Roots of the Indian Lavender Tree." *Acta Botanica Mexicana* 91: 27–36.
- Bonfil-Sanders, C., P.E. Mendoza-Hernández, and J.A. Ulloa-Nieto. 2007. "Root and Callus Development in Cuttings of Seven Species of the Genus *Bursera*." *Agrociencia* 41: 103–9. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33846094919&partnerID=40&md5=8535728500ba0e041d8e235105e239f1>.
- Bonfil-Sanders, Consuelo, Isabel Cajero-Lázaro, and Richard Y. Evans. 2008. "Germinación de Semillas de Seis Especies de *Bursera* Del Centro de México." *Agrociencia* 42: 827–34.
- Castellanos, Carolina, and Consuelo Bonfil. 2010. "Establecimiento Y Crecimiento Inicial de Estacas de Tres Especies de *Bursera* Jacq. Ex L." *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 1: 93–108.
- Chandrasekhar, Thummala, T Mohammad Hussain, and Boddu Jayanand. 2005. "In Vitro Micropropagation of *Boswellia Ovalifoliolata*." *Zeitschrift Für Naturforschung C* 60 (5-6): 505–7.
- Charnov, Eric L. 1982. *The Theory of Sex Allocation. Monographs in Population Biology*. Vol. 18.
- Cheng, Ai-Xia, Yong-Gen Lou, Ying-Bo Mao, Shan Lu, Ling-Jian Wang, and Xiao-Ya Chen. 2007. "Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions." *Journal of Integrative Plant Biology* 49 (2). Blackwell Publishing Asia: 179–86. doi:10.1111/j.1744-7909.2007.00395.x.
- Chomchalow, Narong. 2002. "Production of Aromatic Plants in Asia An Overview." Bangkok, Thailand.
- Daly, D C, M M Harley, M C Martínez-Habibe, and A Weeks. 2011. "Burseraceae." In *Flowering Plants. Eudicots SE - 7*, edited by Klaus Kubitzki, 10:76–104. The Families and Genera of Vascular Plants. Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-14397-7_7.
- Darwin, C. 1877. *The Different Forms of Flowers on Plants of the Same Species*. London: John Murray.
- Diaz-Castro, Esteban. 2009. "Reproducción Y Fenología de *Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón & Medina." Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero.
- Fuentes-López, Martha E, J Carmen Ayala-Sosa, Rogelio Flores-Velázquez, Efraín Cruz-Cruz, Noel Carrillo-Ávila, and Juan Carlos Tamarit-Urias. 2011. *Linaloe [Bursera Linanoe (La Llave) Rzedowski, Calderón & Medina] Una Especie Con Importancia Económica*. Edited by SAGARPA and INIFAP. Folleto Té. Puebla, Pue.: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Geber, M. A., T. E. Dawson, and L. F. Delph, eds. 1999. "Gender and Sexual Dimorphism in

- Flowering Plants.” *American Journal of Botany*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH. doi:10.2307/2656693.
- Hernández-Apolinar, Mariana, Teresa Valverde, and Silvia Purata. 2006. “Demography of *Bursera Glabrifolia*, a Tropical Tree Used for Folk Woodcrafting in Southern Mexico: An Evaluation of Its Management Plan.” *Forest Ecology and Management* 223: 139–51. doi:10.1016/j.foreco.2005.10.072.
- Hernández-Vásquez, R., E. Cruz-Cruz, G. O. Díaz-Zorrilla, M. I. Pérez-León, S. Lozano-Trejo, and V. A. Velasco- Velasco. 2013. “Efecto Del Nitrógeno , Fósforo Y Potasio En Estacas de Linaloe (*Bursera Linanoe*) Andresen * Effect of Nitrogen , Phosphorus and Potassium in Linaloe Cuttings (*Bursera Linanoe*) Andresen Resumen.” *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6: 1119–28.
- Hersch-Martínez, Paul. 2004. “Linaloe, Woodcarving/essential Oil.” In *Riches Os the Forest: Fruits, Remedies Ans Handicrafts in Latin America*, edited by C. López, P. Shanley, and A.C. Fantini, 93–96. Bogor, Indonesia: CIFOR.
- Hersch-Martínez, Paul. 2009. “Perspectivas de La Producción de Linaloe.” [http://www.nacionmulticultural.unam.mx/edespig/diagnostico_y_perspectivas/RECUADROS/CAPITULO 4/2 Perspectivas de la produccion de linaloe.pdf](http://www.nacionmulticultural.unam.mx/edespig/diagnostico_y_perspectivas/RECUADROS/CAPITULO_4/2_Perspectivas_de_la_produccion_de_linaloe.pdf).
- Hersch-Martínez, Paul, and Robert Glass. 2006. *Linaloe : un reto aromático : diversas dimensiones de una especie mexicana, Bursera linanoe*. México, D.F.: Instituto Nacional de Antropología e Historia.
- Hilje, Branko, Julio Calvo-alvarado, César Jiménez-rodríguez, Arturo Sánchez-azofeifa, San José, Costa Rica, Escuela De Ingeniería Forestal, Tecnológico De Costa Rica, and Costa Rica. 2015. “Tree Species Composition , Breeding Systems , and Pollination and Dispersal Syndromes in Three Forest Successional Stages in a Tropical Dry Forest in Mesoamerica.” *Tropical Conservation Science* 8 (1): 76–94.
- House, S. M. 1992. “Population Density and Fruit Set in Three Dioecious Tree Species in Australian Tropical Rain Forest.” *J. Ecol.* 80: 57–69.
- Joy, P.P., Thomas J., S. Mathew, and B.P. Skaria. 2001. “Aromatic Plants.” In *Tropical Horticulture Vol.2*, edited by T.K. Bose, J. Kabir, and P.P. Joy, 633–733. Naya Prakash, Calcutta.
- Juárez-Luke, N. 2006. “Estado Actual Del Conocimiento de *Bursera Linanoe* (La Llave) Rzendowski, Calderón et Medina.” Universidad autónoma Chapingo, México.
- Kant, Tarun, Sushma Prajapati, and Parma Ashok Kumar. 2010. “Efficient Micropropagation from Cotyledonary Node Cultures of *Commiphora wightii* (Arn.) Bhandari, an Endangered Medicinally Important Desert Plant.” *Plant Development* 7: 37–34.
- Kliebenstein, D.J. 2014. “Orchestration of plant defense systems: genes to populations.” *Trends in Plant Science*, 19(4), pp.250–255. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2014.01.003>.
- Neilson, E.H. et al. 2013. “Plant chemical defense: at what cost?” *Trends in Plant Science*, 18(5), pp.250–258. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.001>.

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Lahlou, Mouhssen. 2004. “Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils.” *Phytotherapy Research* 18 (6). John Wiley & Sons, Ltd.: 435–48. doi:10.1002/ptr.1465.
- Lloyd, David G, and C J Webb. 1977. “Secondary Sex Characters in Plants.” *The Botanical Review* 43 (2). Springer: 177–216.
- Lloyd G.B., McCown B.H. 1980. “Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture.” *International Plant Propagators’ Society Combined Proceedings*, 30: 421–427.
- Lucero-Gómez, P., C. Mathe, C. Vieillescazes, L. Bucio, I. Belio, and R. Vega. 2014. “Analysis of Mexican Reference Standards for *Bursera* Spp. Resins by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Application to Archaeological Objects.” *Journal of Archaeological Science* 41: 679–90. doi:10.1016/j.jas.2013.07.021.
- Peres, Carlos A, Claudia Baider, Pieter A Zuidema, Lúcia H O Wadt, Karen A Kainer, Daisy A P Gomes-Silva, Rafael P Salomão, et al. 2003. “Demographic Threats to the Sustainability of Brazil Nut Exploitation.” *Science (New York, N.Y.)* 302 (5653): 2112–14. doi:10.1126/science.1091698.
- Peters, Charles M., Silvia E. Purata, Michael Chibnik, Berry J. Brosi, Ana M. López, and Myrna Ambrosio. 2003. “The Life and Times of *Bursera Glabrifolia* (H.B.K.) Engl. in Mexico: A Parable for Ethnobotany.” *Economic Botany*. doi:10.1663/0013-0001(2003)057[0432:TLATOB]2.0.CO;2.
- Queenborough, Simon A., D. F R P Burslem, Nancy C. Garwood, and Renato Valencia. 2007. “Determinants of Biased Sex Ratios and Inter-Sex Costs of Reproduction in Dioecious Tropical Forest Trees.” *American Journal of Botany* 94: 67–78. doi:10.3732/ajb.94.1.67.
- Ramos-Ordoñez, María F., M. Del Coro Arizmendi, Martha Martínez, and Judith Márquez-Guzmán. 2013. “The Pseudaril of *Bursera* and *Commiphora*, a Foretold Homology?” *Revista Mexicana de Biodiversidad*. doi:10.7550/rmb.32114.
- Rzedowski, J. and Kruse. 1979. “Algunas Tendencias Evolutivas En *Bursera* (Burseraceae).” *Taxon* 28 (1/3): 103–16.
- Rzedowski, J., L.R. Medina, and G. Calderón de R. 2004. “Las Especies de *Bursera* (Burseraceae) En La Cuenca Superior Del Río Papaloapan, México.” *Acta Bot.Mex.*
- Singh, J. 2008. “Maceration, Percolation and Infusion Techniques for the Extraction of Medicinal and Aromatic Plants.” *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology Trieste, 67.
- Stacey, R. J., C. R. Cartwright, and C. McEwan. 2006. “Chemical Characterization of Ancient Mesoamerican ‘Copal’ Resins: Preliminary Results.” *Archaeometry* 48: 323–40. doi:10.1111/j.1475-4754.2006.00259.x.

- Swetha, H. 2005. "Propagation of Indian Lavender (*Bursera Delpechiana* Poiss. Ex Engl.) through Cuttings under Mist." University of Agricultural Sciences, Dharwad.
- Vázquez-Cisneros, Isaac. 2014. "Producción de Embriones Somáticos de *Bursera Linanoe* (La Llave) Rzed., Calderón & Medina, En Biorreactores de Sistema de Inmersión Temporal." Colegio de Postgraduados.
- Wu, Shuiqin, and Joe Chappell. 2008. "Metabolic Engineering of Natural Products in Plants ; Tools of the Trade and Challenges for the Future." *Current Opinion in Biotechnology* 19: 145–52. doi:10.1016/j.copbio.2008.02.007.
- Yakimowski, S B, and S C H Barrett. 2014. "Variation and Evolution of Sex Ratios at the Northern Range Limit of a Sexually Polymorphic Plant" 27: 1454–66. doi:10.1111/jeb.12322.