



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

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

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN CIENCIAS FORESTALES

CLONACIÓN DE ÁRBOLES MADUROS DE *Pinus leiophylla* SCHIEDE EX SCHLTDL. *ET* CHAM. DE UN HUERTO SEMILLERO SEXUAL

BENITO GONZÁLEZ JIMÉNEZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

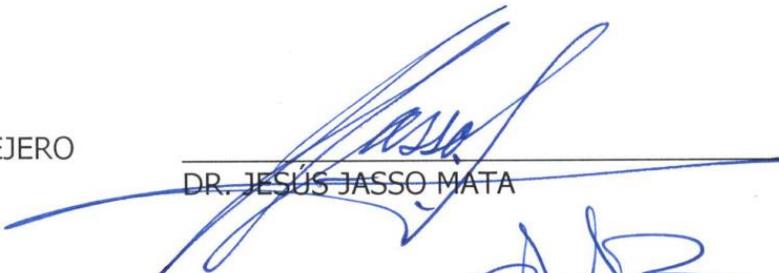
**“CLONACIÓN DE ÁRBOLES MADUROS DE *Pinus leiophylla*
SCHIEDE EX SCHLTDL. *ET* CHAM. DE UN HUERTO SEMILLERO
SEXUAL”**

La presente tesis titulada: "**Clonación de árboles maduros de *Pinus leiophylla Schiede ex Schlttd. et Cham. de un huerto semillero sexual***" realizada por el alumno: Benito González Jiménez, 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
EN CIENCIAS FORESTALES**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. JESÚS JASSO MATA

ASESOR



DR. MARCOS JIMÉNEZ CASAS

ASESOR



DR. CARLOS ROMÁN CASTILLO MARTÍNEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, abril 2017

CLONACIÓN DE ÁRBOLES MADUROS DE *Pinus leiophylla* SCHIEDE EX SCHLTDL. ET
CHAM. DE UN HUERTO SEMILLERO SEXUAL

Benito González Jiménez, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

Se experimentó la clonación por injerto y cultivo *in vitro* de árboles maduros de *Pinus leiophylla* de un huerto semillero sexual (HSS), dichos árboles son sobrevivientes al ataque de la plaga *Toumeyella pinicola* Ferris, presentan mejores características fenotípicas y son muy buenos productores de semilla del huerto. En el Capítulo II, se realizó la clonación por injerto de árboles maduros de *P. leiophylla*, donde el prendimiento del injerto (PI) a los 60 días varió entre los cuatro genotipos probados; los más altos porcentajes de PI fueron sobre patrones de 1 año, el estado 1 de desarrollo de la púa y aplicando el injerto lateral entre 5-10 cm a partir de la base. En el crecimiento en longitud del injerto (CLI) a los 120 días, hubo variación entre los genotipos probados, se favoreció el CLI en patrones de 2 años, estado 1 de desarrollo de la púa y en injertos terminales. En el Capítulo III, se probó la respuesta de explantes de árboles de *P. leiophylla* en las etapas de establecimiento y multiplicación *in vitro*. En la fase de establecimiento se probaron explantes de yemas apicales de ramas y brotes epicórmicos (BE) de árboles del HSS, logrando solo el establecimiento *in vitro* de BE. En la fase de multiplicación se evaluó el efecto de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) en explantes de BE de árboles maduros del HSS contrastando su respuesta con explantes de BE de árboles juveniles de 2 años, sobre la inducción, número y longitud de brotes adventicios. La aplicación de RCV favoreció la inducción de brotes adventicios y no se encontraron diferencias entre explantes, sin embargo, los de fuentes juveniles mostraron los valores más altos en inducción, número y longitud de brotes adventicios.

Palabras clave: *Pinus leiophylla*, brotes epicórmicos, clonación, cultivo *in vitro*, injerto.

CLONING OF MATURE TREES OF *Pinus leiophylla* SCHIEDE EX SCHLTDL. ET CHAM.
FROM A SEXUAL SEED ORCHARD

Benito González Jiménez, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

Cloning by graft and *in vitro* culture were experienced of mature *Pinus leiophylla* trees from a sexual seed orchard (SSO), these trees are survivors to the attack a foliage sucking plague *Toumeyella pinicola* Ferris, have good phenotypic characteristics and these trees are very good seed producers in the orchard. In chapter II cloning of mature trees was carried out and when graft success (GS) was evaluated at 60 days, this varied among the genotypes tested; the higher percentages of GS were on 1 year old rootstocks, scion development status 1 and lateral graft between 5-10 cm from the base. Growth length graft (GLG) at 120 days was variable among the genotypes tested, the GLG was favored on 2 years old rootstocks, scion development status 1 and terminal graft. In Chapter III the response tree explants of *P. leiophylla* were tested in the stages of establishment and *in vitro* multiplication. In the establishment stage, branch's buds from and epicormic shoots (ES) SSO's trees were tested, achieving only the *in vitro* establishment ES. In the multiplication stage, plant growth regulators (PGR) effect was evaluated in ES explants of mature trees from SSO contrasting their response with ES explants of 2 years old juvenile trees for induction, and number and length of adventitious shoots. PGR application favored induction of adventitious shoots, we did not found differences among explants, however, the explants from juvenile sources showed the highest values for induction, and number and length of adventitious shoots.

Keywords: *Pinus leiophylla*, epicormic shoots, cloning, *in vitro* culture, graft.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), mediante el programa de becas del cual fui beneficiado para lograr la realización de mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, por permitirme continuar mi formación académica en el Postgrado en Ciencias Forestales.

Al CENID-COMEF del INIFAP y a sus autoridades, por permitirme desarrollar en sus instalaciones del laboratorio de biotecnología, parte de la investigación contenida en este trabajo.

A los integrantes de mi Consejo Particular: a todos les agradezco su amistad sincera.

Dr. Jesús Jasso Mata, quien, con su vasta experiencia en el sector forestal de México, ha fortalecido mi desarrollo profesional y por permitirme realizar este trabajo bajo su dirección, por su apoyo incondicional durante todas las etapas de esta maestría, así como por su confianza puesta en mí, para resolver los obstáculos que representaba esta investigación.

Dr. Marcos Jiménez Casas, por su gran apoyo en la planeación y desarrollo de la investigación, por sus oportunas aportaciones, observaciones y correcciones hechas, basadas en su amplia experiencia, que mejoraron significativamente la calidad de este trabajo, por su tiempo y disponibilidad durante las asesorías.

Dr. Carlos Román Castillo Martínez, por aceptar ser parte de mi Consejo Particular, por su apoyo y sus atentos aportes durante toda la investigación, que mediante las observaciones y sabias ideas hechas oportunamente enriquecieron este trabajo, particularmente por las facilidades y conocimientos proporcionados durante la etapa de laboratorio.

Al Sr. **Luis Méndez Hidalgo**, por el gran apoyo y compartirme sus acertados consejos basados en su experiencia, que ayudaron al éxito de este trabajo, particularmente en la parte de injertos hechos en esta investigación, así como por su grata disposición, buen ánimo y amistad.

A todos mis profesores de los cursos tomados, por proporcionarme los conocimientos que han adquirido durante su amplia experiencia en sus áreas particulares. En particular a todos los amigos encontrados durante mi estancia de maestría quienes hicieron más agradable esta etapa de mi vida e hicieron más fácil los momentos difíciles.

DEDICATORIA

- ♣ *A mi esposa **Esther Paredes Díaz**, por su amor, apoyo y paciencia brindada, que me dio la fuerza necesaria para concluir satisfactoriamente este objetivo.*

- ♣ *Con especial amor a mis padres: **Ernestina Jiménez Arroyo y Juan Manuel González Guerrero**, por su amor incondicional durante toda mi vida, son mi fuente de inspiración para seguir adelante.*

- ♣ *Comparto este objetivo cumplido con mis hermanos: Sandra y Juan Carlos; con mis sobrinas: Aranza y Sofía; sobrinos: Josué y Diego; con todos mis familiares: primas, primos, tías, tíos, sobrinas y sobrinos; así como con todos mis amigos que he encontrado afortunadamente a lo largo de mi vida.*

CONTENIDO

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. LITERATURA CITADA	6
CAPITULO II: CLONACIÓN POR INJERTO DE ÁRBOLES MADUROS DE <i>Pinus leiophylla</i> DE UN HUERTO SEMILLERO SEXUAL	9
2.1. RESUMEN	9
2.2. ABSTRACT.....	10
2.3. INTRODUCCIÓN	11
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.4.1. Características de las púas.....	14
2.4.2. Recolecta de las púas	16
2.4.3. Características de la planta patrón	17
2.4.4. Injertado	18
2.4.5. Técnica de injerto terminal	19
2.4.6. Técnica de injerto lateral.....	21
2.4.7. Condiciones ambientales experimentales	21
2.4.8. Fertilización y riego	22
2.4.9. Variables a evaluar.....	22
2.4.9.1. Prendimiento o éxito del injerto (PI).....	22
2.4.9.2. Crecimiento en longitud del injerto (CLI)	23
2.4.10. Diseño experimental	24
2.4.11. Actividades posteriores al prendimiento.....	25
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
2.5.1. Prendimiento de injertos	27
2.5.1.1. Efecto del genotipo	28
2.5.1.2. Efecto de la edad del patrón.....	30
2.5.1.3. Efecto del estado de desarrollo de la púa	31
2.5.1.4. Efecto del tipo de injerto.....	32
2.5.1.5. Efecto de la interacción entre factores	34

2.5.2. Supervivencia de injertos	35
2.5.3. Crecimiento en longitud del injerto	36
2.5.3.1. Efecto del genotipo	37
2.5.3.2. Efecto de la edad del patrón	38
2.5.3.3. Efecto del estado de desarrollo inicial de la púa	39
2.5.3.4. Efecto del tipo de injerto	39
2.5.3.5. Efecto de la interacción entre factores	40
2.6. CONCLUSIONES	41
2.7. LITERATURA CITADA	42
CAPITULO III. RESPUESTA DE <i>Pinus leiophylla</i> EN LAS FASES DE ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN <i>IN VITRO</i>	46
3.1. RESUMEN	46
3.2. ABSTRACT	47
3.3. INTRODUCCIÓN	48
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.4.1. Fase de establecimiento	50
3.4.2. Fase de multiplicación	52
3.4.3. Diseño experimental	53
3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
3.5.1. Fase de establecimiento	54
3.5.1.1. Establecimiento de yemas	54
3.5.1.2. Establecimiento de brotes epicórmicos	56
3.5.2. Fase de multiplicación	58
3.5.2.1. Factor explante	58
3.5.2.2. Factor medio de cultivo	61
3.6. CONCLUSIONES	64
3.7. LITERATURA CITADA	65

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Procedencia de los árboles seleccionados de *P. leiophylla* para su clonación por injerto de un huerto semillero sexual (HSS). 14
- Cuadro 2.** Longitud y diámetro (\emptyset) promedio y desviación estándar (n= 90) de las púas de *P. leiophylla* por árbol usadas en los injertos, para los estados de desarrollo E1 y E2. 15
- Cuadro 3.** Promedio y desviación estándar de longitud total y diámetro (\emptyset) en el punto de unión para cada edad del patrón utilizado al momento de realizar el injerto. 18
- Cuadro 4.** Calendario de injertado para *P. leiophylla*. 19
- Cuadro 5.** Valores de significancia de (p) del análisis de varianza de la variable de prendimiento a los 60 días y crecimiento en longitud del injerto a los 60, 90 y 120 días de *P. leiophylla*. 28
- Cuadro 6.** Valor promedio y error estándar para cada factor de los tratamientos probados en el PI (%) a los 60 días y CLI (cm) a los 60, 90 y 120 días de *P. leiophylla*. 30
- Cuadro 7.** Respuesta de establecimiento *in vitro* de dos tipos de explantes de árboles maduros de *P. leiophylla* a los 30 días de su cultivo. 54
- Cuadro 8.** Valores de significancia de (p) del análisis de varianza de las variables de crecimiento del explante, inducción, número y longitud de brotes adventicios de *P. leiophylla* a los 30 días del establecimiento *in vitro*. 59
- Cuadro 9.** Valor promedio y error estándar para cada factor de los tratamientos probados en el crecimiento del explante, inducción, número y longitud de brotes y contaminación de *P. leiophylla* a los 30 días de su cultivo *in vitro*. 61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estado de desarrollo de las púas de *P. leiophylla* denominadas “estado 1”. a) púa antes de recolecta, b) púas recolectadas, c) corte longitudinal en la parte central de la púa. 15
- Figura 2.** Estado de desarrollo de las púas de *P. leiophylla* denominadas “estado 2”. a) púas colectadas, b) corte longitudinal en la parte central de la púa, c) longitud de púa. 16
- Figura 3.** Colecta de púas de árboles maduros de *P. leiophylla* para su posterior injertado. a) recolección de púas, b) lavado y enjuague, c) inmersión en fungicida, d) colocación en hielera..... 16
- Figura 4.** Patrones para injerto de *P. leiophylla*. a) 1 año, b) 2 años y c) 4 años..... 18
- Figura 5.** Etapas de la técnica de injerto terminal realizado en *P. leiophylla*. a) decapitación, b) hendidura, c) corte de la base de la púa, d) corte en bisel, e) union del injerto, f) recubrimiento plástico, g) colocación de bolsa. 20
- Figura 6.** Etapas en injerto lateral de *P. leiophylla*. a) corte del tallo del patrón, b) hendidura, c) corte en bisel de la púa, d) empalme púa-patrón, e) recubrimiento del punto de unión, f) colocación de la bolsa. 21
- Figura 7.** Condiciones ambientales experimentales. a) invernadero con malla sombra, b) condiciones internas del invernadero, c) medición de temperatura y humedad relativa. 22
- Figura 8.** Categorías de prendimiento en los injertos de *P. leiophylla* después de 60 días de injertado. a) “muerto”, b) “vivo sin respuesta”, c) “vivo con respuesta”. 23
- Figura 9.** Retiro de bolsa y recubrimiento en injertos de *P. leiophylla*. a) y b) retiro de la bolsa, c) y d) retiro del recubrimiento y e) aplicación de cera en fisuras..... 25
- Figura 10.** Poda de patrón en injertos de *P. leiophylla*. a) competencia de rebrote, b) competencia de ramas en injerto terminal, c) patrón podado injerto terminal, d) estructura aérea a podar en injertos laterales, e) patrón podado injerto lateral..... 26
- Figura 11.** Interacciones con $p \leq 0.05$ para el PI de *P. leiophylla*. a) genotipo-edad del patrón, b) genotipo-estado de desarrollo de la púa, c) edad del patrón-estado de desarrollo de la púa; cada punto representa el promedio con el error estándar..... 34
- Figura 12.** Supervivencia de injertos exitosos de *P. leiophylla* del día 61-240..... 35
- Figura 13.** Crecimiento en longitud del injerto (cm) por factor. a) genotipo, b) edad del patrón, c) estado de desarrollo de la púa y d) tipo de injerto. 37

Figura 14. Interacciones con significancia ($p \leq 0.05$) para el crecimiento en longitud del injerto (cm) en <i>P. leiophylla</i> . a) 60 días, b) 90 días, c) 120 días; cada punto representa el promedio con el error estándar.	40
Figura 15. Explantes de árboles adultos de <i>P. leiophylla</i> . a) y b) explantes de yema, c) yemas sin escamas, d) yema cultivada <i>in vitro</i> , e) árbol donador, f) y g) brotes epicórmicos, h) preparación de explantes, i) brote epicórmico cultivado <i>in vitro</i>	51
Figura 16. Actividades para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>P. leiophylla</i> . a-d) medio de cultivo MS, e) campana de flujo laminar, f) cultivo <i>in vitro</i> , g) cuarto de incubación.....	52
Figura 17. Establecimiento <i>in vitro</i> de yemas apicales de árboles adultos de <i>P. leiophylla</i> . a) primer día de cultivo, b) y c) oxidación de yemas, d y e) contaminación por bacteria.	56
Figura 18. Establecimiento <i>in vitro</i> de BE de árboles adultos de <i>P. leiophylla</i> . a) primer día de cultivo, b) 7 días, c) 15 días, d) 23 días, e-m) 30 días.	57
Figura 19. Inducción de brotes adventicios de explantes cultivados <i>in vitro</i> de <i>P. leiophylla</i> . Las imágenes superiores corresponden a explantes de árboles maduros y las inferiores a juveniles. a) MS1, b) MS2, c) MS3, d y e) MS4, f) MS1, g) MS2, h) MS3, i-k) MS4.	60

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

México es el país con el mayor número de especies de pino en el mundo (Perry, 1991), de las 97 especies de este género (Eckenwalder, 2009), en los bosques de coníferas de México se distribuyen de manera natural poco más de 50 (Vargas et al., 2004). *Pinus leiophylla*, es una de las especies de este género con más amplio rango de distribución actualmente en México (19 estados), aunque no en volumen, rara vez forma masas puras (Eguiluz, 1978; Perry, 1991). Esta amplia distribución de la especie probablemente está asociada con su fuerte habilidad de colonización (Rodríguez-Banderas et al., 2009). Ocupa el segundo lugar en mayor producción de resina en el país después de *Pinus oocarpa*, principalmente en los estados de Michoacán, Jalisco y México (Perry, 1991; SEMARNAT, 2013). Sin embargo, su mayor importancia es ecológica, por lo que es una especie a considerar en programas de reforestación de sitios degradados (Dvorak, 2007; Eguiluz, 1978). A nivel mundial se han establecido plantaciones experimentales para el control de la erosión y conservación de suelo en Asia, África, El Caribe, Sudamérica y Oceanía (Rodríguez-Franco, 2002).

Eguiluz (1978) indica que a lo largo del tiempo han existido problemas de tala inmoderada de *P. leiophylla* porque su rango de distribución altitudinal coincide con alturas adecuadas para algunos cultivos agrícolas, reduciendo su frecuencia a cero en algunos lugares del Valle de México, lo que nos pudiera indicar que a la fecha sus poblaciones hayan disminuido considerablemente. Otro de los problemas asociados a la reducción de sus poblaciones, son los efectos de cambio climático; Sáenz et al. (2015) desarrollaron un modelo para predecir y mapear el nicho climático de *P. leiophylla* prediciendo que el área ocupada por esta especie disminuirá drásticamente, para 2030 será del 35 %. En una investigación realizada por Morales et al. (2010), encontraron valores reproductivos de *P. leiophylla* muy bajos, pudiendo deberse al proceso de endogamia, consecuencia de la baja producción de polen por área, asociada a la baja densidad de árboles, ya que no forma rodales puros y por la reducción de las poblaciones por la tala, por ello sugiere un programa de rescate y conservación de estas poblaciones remanentes.

Una de las maneras para realizar la conservación de los recursos genéticos forestales es de forma *ex situ*, que incluye el establecimiento de huertos semilleros (Ledig, 2004), el cual es una plantación de árboles seleccionados fenotípicamente por alguna característica deseada, dichos árboles se aíslan en una ubicación física para evitar la polinización de fuentes externas y se

maneja para producir semilla de alta calidad genéticamente mejorada adaptada a una localidad específica y utilizarse para el establecimiento de plantaciones operacionales. Los huertos semilleros sexuales (HSS) se establecen con planta producida por semilla (reproducción sexual) colectada de individuos superiores de un gran número de familias no relacionadas genéticamente entre sí y haciendo una depuración posterior que elimina a los árboles indeseables con base en los resultados de pruebas de progenie (White et al., 2007; Zobel & Talbert, 1988).

El HSS del cual se obtuvo el material vegetal para esta investigación, surge del trabajo reportado por Moreno (1985), de un estudio de procedencias que estableció el Colegio de Postgraduados con semilla de árboles *P. leiophylla* de 16 rodales naturales (procedencias) del centro del país (Puebla, Tlaxcala, Estado de México y Ciudad de México) el criterio de selección aplicado fue utilizando las siguientes características fenotípicas: árboles dominantes o codominantes que presentaran un aspecto satisfactorio en: altura, forma, ramas y sanidad. De acuerdo con Gómez (2009) del estudio de procedencias progenie establecido en 1987 se seleccionaron 180 árboles que presentaron mayor tolerancia a la salinidad (evaluada por su coloración), sequía, bajas temperaturas, mayor altura, con follaje más verde y mayor número de ramas. Con ellos se estableció en 1991 el HSS de *P. leiophylla* plantados a 4x4 m (Jasso et al., 1993), ubicado en las coordenadas geográficas 19° 27'34.8" LN y 98° 54'15.8" LO, a una altitud de 2249 m (Cuevas et al., 2015). El clima es templado con lluvias en verano, precipitación media anual de 559 mm, concentrándose principalmente en los meses de junio a septiembre, aunque se les aplica riego en época de sequía, temperatura media anual de 15.3 °C (Gómez et al., 2010), bajas temperaturas de 8.2 °C media mínima anual y enero siendo el mes más frío con un promedio mínimo mensual de 3.9 °C (Servicio Meteorológico Nacional, 2010). El suelo es Solonchak-Gleyico de tipo lacustre con exceso de sal (Gómez et al., 2010) y alcalino con alto pH de hasta 7.6 o más, ya que el sitio se encuentra a orillas de lo que fue el vaso del lago de Texcoco (López & Estañol, 2007).

El objetivo del huerto es generar germoplasma tolerante a factores adversos (suelos salinos, alto pH y escasa precipitación) mediante polinización libre por hibridación geográfica intraespecífica (Jasso et al., 1993; Jasso & Jiménez, 1994); dicho germoplasma sería utilizado para reforestar áreas en donde las poblaciones de *P. leiophylla* han sido reducidas o eliminadas en la región centro del país, en áreas degradadas y algunas otras que presenten características ambientales y de suelo similares en las que se encuentra el HSS (Jasso & Jiménez, 1994). A la fecha quedan 81

árboles en pie correspondiente al 45 % de sobrevivencia, la principal causa de muerte se debió al ataque de una plaga chupadora del follaje *Toumeyella pinicola* Ferris (Jiménez & Jasso, 2011), escama de la familia Coccidae que se alimenta de la sabia de algunas especies del género *Pinus* ocasionando la muerte celular del follaje y partes vegetativas en crecimiento (Cibrián et al., 1995; Jiménez & Jasso, 1994) el resto de los árboles muertos han sido derribados por el viento e incidencia de rayos.

Dentro de las actividades de mejoramiento genético forestal que se están desarrollando en México incluye el HSS de *P. leiophylla* antes descrito, del cual se han identificado algunos genotipos de importancia que se han seleccionado para su clonación y que con la propagación vegetativa se puede lograr. Esta consiste en la obtención de nuevos individuos a partir de partes vegetativas, las cuales tienen la capacidad de regeneración (Hartmann et al., 2011) y proporciona la posibilidad de multiplicar íntegramente la combinación genética favorable de un árbol superior seleccionado en base a características deseables que se quieren perpetuar (Niemi et al., 2007; Zobel & Talbert, 1988). La propagación vegetativa permite captar y transferir al nuevo árbol todo el potencial genético del árbol donador de manera rápida (Zobel & Talbert, 1988).

Al hablar de clones, es importante diferenciar los términos sobre “ortet”: es el árbol original del cual es tomado el material vegetal. Un “ramet”: es el propágulo de un ortet convertido en una planta con el mismo genotipo de dicho ortet, por lo tanto, un “clon” consiste de todos los ramets de un solo ortet considerados colectivamente (Hartmann et al., 2011; Wright, 1976).

La propagación vegetativa puede ser conseguida por varios métodos, cada uno presenta ventajas y desventajas en su aplicación. Macropropagación a través de injertos, enraizamiento de estacas o acodo aéreo y Micropropagación por cultivo *in vitro*. Varios de estos métodos están siendo practicados en coníferas (Bonga, 2016; Zobel & Talbert, 1988), pero la elección del más adecuado depende de muchos factores: objetivo y sitio para el cual se utilizará el clon, la especie y sus características fisiológicas, fenológicas, ontogénicas y morfológicas particulares.

Los injertos se realizaron primero en la agricultura y ahora son ampliamente usados en fruticultura, pero la aplicación en árboles forestales ha sido más reciente (Hartmann et al., 2011) y es una alternativa de clonación para árboles en la fase adulta que presentan baja o nula capacidad de desarrollo de raíces adventicias y no se pueden aplicar las técnicas de enraizamiento de estacas o acodos (Dhawan & Saxena, 2004). Se han desarrollado diversas

investigaciones de injertos en coníferas a nivel mundial, sin embargo, en México ha sido poco documentada, ya que solo existen algunos reportes con éxito a partir de las últimas 4 décadas, aplicada al género *Pinus*. El primer reporte en 1978 con *Pinus pseudostrobus* Lindl. (Carrera & Villaseñor, 1982), posteriormente en *P. patula* (Villaseñor & Carrera, 1980); *P. pseudostrobus* Var. Oaxacana Mtz. (Barbosa et al., 1984); *P. michoacana* Mtz. (Ruíz, 1985); *P. gregii* (Becerra & Plancarte, 1993); *P. pseudostrobus* (Muñoz et al., 2013).

El cultivo de tejidos *in vitro* es el método de propagación más reciente y se utiliza como una alternativa de clonación en coníferas adicional a los métodos convencionales (Niemi et al., 2007), este es el cultivo de segmentos de plantas llamados explantes dentro de recipientes de vidrio en condiciones asépticas en un medio de cultivo artificial y condiciones ambientales controladas (Hartmann et al., 2011). De acuerdo con Parasharami et al. (2003) en la mayoría de las investigaciones que han tenido éxito utilizando esta técnica fue a partir de explantes juveniles (embriones inmaduros, semillas, plántulas y cotiledones), como Zhu et al. (2010) en *Pinus massoniana*, Stojičić et al. (2012) en *Pinus peuce*, Rodríguez et al. (2015) en *Pinus radiata*; no obstante, muchas de las características de interés no pueden ser evaluadas hasta que los árboles llegan a la fase de madurez (Greenwood, 1995). La mayoría de las gimnospermas todavía son consideradas como extremadamente difíciles de micropropagar en individuos de más allá de la etapa de plántula y solo han sido reportados algunos estudios exitosos en coníferas maduras (Andersone & Ievinsh, 2002; Cortizo et al., 2009; Chang et al., 2001; De-Diego et al., 2008; De-Feria et al., 2009; Parasharami et al., 2003; Selby et al., 2005).

El presente trabajo tiene el objetivo de lograr la clonación de algunos genotipos de importancia en fase adulta de más de 28 años de edad de un HSS de *P. leiophylla*, mediante la técnica de injerto y en las primeras fases del cultivo de tejidos.

En el segundo capítulo se realizó la clonación por injerto para *P. leiophylla* bajo condiciones de invernadero, evaluando el efecto de: cuatro genotipos (101, 51, 34 y 168); tres diferentes edades de patrón (1, 2 y 4 años), dos estados de desarrollo inicial de la púa denominados (estados 1 y 2) y tres tipos de técnicas de injerto (terminal y lateral a dos diferentes alturas a 5-10 y 15-20 cm a partir de la base); sobre el efecto en el prendimiento (éxito) del injerto a los 60 días y crecimiento en longitud de la púa injertada a los 120 días.

En el tercer capítulo se probó la respuesta de explantes de árboles de *P. leiophylla* en las primeras etapas de clonación *in vitro* (fase de establecimiento y multiplicación). En la fase de establecimiento se probaron dos tipos de explantes (brotes epicórmicos y yemas apicales de ramas) en un medio MS de árboles maduros del HSS. En la fase de multiplicación se evaluaron los efectos de tres medios con una mezcla de citocinina (BA) y auxina (ANA) en proporción 10:1 y un medio sin reguladores de crecimiento vegetal, así como explantes de árboles maduros del HSS contrastando su respuesta con explantes de árboles juveniles de 2 años, sobre la inducción, número y longitud de brotes adventicios.

1.1. LITERATURA CITADA

- Andersone, U., & Ievinsh, G. (2002). Changes of morphogenic competence in mature *Pinus sylvestris* L. buds *in vitro*. *Annals of botany*, 90(2), 293-298.
- Barbosa G. M. G., Sánchez, A. V., & Velasco, F. V. (1984). Pruebas de injertado en *Pinus pseudostrobus* var. Oaxacana Mtz. en los altos de Chiapas. Boletín técnico No. 99, SARCH, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales [INIF]. 35 p.
- Becerra, O. E. C., & Plancarte, B. A. (1993). Propagación asexual en *Pinus greggii*, injertos, enraizado de estacas y acodos aéreos. *Agrociencia, Recursos renovables*, 3(1), 97-110.
- Bonga, J. M. (2016). Conifer clonal propagation in tree improvement programs. In Park, Y., Bonga, J., & Moon, H., *Vegetative propagation of forest trees*. (pp. 3-31). Seoul, Korea: National Institute of Forest Science.
- Carrera, G. M. S. & Villaseñor, R. R. (1982). Ensayo de dos métodos de injerto en *Pinus pseudostrobus* Lindl. Boletín técnico no. 75. SARH. SFF. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales [INIF]. México, D. F.: INIF.15 p.
- Cibrián, T. D., Méndez, M. T. J., Campos, B. R., Yates, III O. H., & Flores L. J. E. (1995). *Insectos Forestales de México*. Edo. de México, México: Universidad Autónoma Chapingo. pp. 234.
- Cortizo, M., de Diego, N., Moncaleán, P., & Ordás, R. J. (2009). Micropropagation of adult stone pine (*Pinus pinea* L.). *Trees*, 23(4), 835-842.
- Cuevas, C. J. C. (2014). *Propagación vegetativa de Pinus leiophylla SCHIEDE EX SCHLTDL. ET CHAM*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Texcoco, Edo. de México, México. 72 p.
- Cuevas, C. J. C., Jiménez, C. M., Jasso, M. J., Pérez, R. P., López, U. J., & Villegas, M. Á. (2015). Propagación asexual de *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. et Cham. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 21(1), 81-95.
- Chang, S. H., Ho, C. K., Chen, Z. Z., & Tsay, J. Y. (2001). Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. *Plant Cell Reports*, 20(6), 496-502.
- De-Diego, N., Montalbán, I. A., Fernández de Larrinoa, E., & Moncaleán, P. (2008). *In vitro* regeneration of *Pinus pinaster* adult trees. *Canadian journal of forest research*, 38(10), 2607-2615.
- De-Feria, M., Chávez, M., Barbón, R., La, M., Pérez, M., Jiménez-Terry, F., ... & Agramonte, D. (2009). Multiplicación *in vitro* de plantas de *Pinus caribaea* var. *caribaea*. *Biotechnología vegetal*, 9(4), 217-224.
- Dhawan, V., & Saxena, S. (2004). Cloning Forestry Species. In Sirivastava, P. S., Narula, A., & Sirivastava, S., *Plant Biotechnology and Molecular Markers* (pp. 183-194). New Delhi, India: Springer Netherlands.
- Dvorak, W. S., Hodge, G. R., & Kietzka, J. E. (2007). Genetic variation in survival, growth, and stem form of *Pinus leiophylla* in Brazil and South Africa and provenance resistance to pitch canker. *Southern Hemisphere Forestry Journal*, 69(3), 125-135.
- Eckenwalder, J. E. (2009). *Conifers of the world: the complete reference*. Timber Press. pp. 399.

- Eguiluz, P. T. (1978). Ensayo de integración de los conocimientos sobre el género *Pinus* en México. Tesis de. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. de México, México. pp. 134-149.
- Gómez, J. D. M. (2009). *Características reproductivas y germinación de semillas de Pinus leiophylla en un huerto semillero sexual*. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. de México, México. 33 p.
- Gómez, J. D. M., Ramírez, H. C., Jasso, M. J., & López, U. J. (2010). Variación en características reproductivas y germinación de semillas de *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. *Revista fitotecnia mexicana*, 33(4), 297-304.
- Greenwood, M. S. (1995). Juvenility and maturation in conifers: current concepts. *Tree Physiology*, 15(7-8), 433-438.
- Hartmann, T. H., Kester, E. D., Davies, Jr. T. F. & Geneve, L. R. (2011). Plant propagation principles and practices (18 va ed.). New Jersey, EUA: Prentice Hall. 915 p.
- Jasso, M. J., López, U. J., Jiménez, C. M., & Jacob, C. V. (1993). Evaluación fenológica vegetativa de *Pinus leiophylla* en un huerto semillero. I Congreso Mexicano Sobre Recursos Forestales. Saltillo, Coahuila. México. pp. 97.
- Jasso, M. J., & Jiménez, C. M. (1994). Fenología vegetativa y reproductiva de *Pinus leiophylla* en un huerto semillero sexual. XV Congreso de Fitogenética. pp. 194.
- Jiménez, C. M. & Jasso, M. J. (2011). Infección por escamas en árboles de un huerto semillero sexual de *Pinus leiophylla* Schl. et Cham. XVI Simposio Nacional de Parasitología Forestal. Cuernavaca Morelos. pp. 226.
- Ledig, F. T. (2004). Conservación y manejo de recursos genéticos forestales. In Vargas, H. J. J., Bermejo, V. B., & Ledig, T. F. (Eds.), *Manejo de recursos genéticos forestales* (2a ed.) (pp. 3-18). Edo. De México, México: COLPOS y CONAFOR.
- López-López, M. Á., & Estañol-Botello, E. (2007). Detección de deficiencias de hierro en *Pinus leiophylla* a partir de los efectos de dilución y concentración nutrimental. *Terra Latinoamericana*, 25(1), 9-15.
- Morales, V. M. G., Ramírez, M. C. A., Delgado, V. P., & López, U. J. (2010). Indicadores reproductivos de *Pinus leiophylla* Schltdl. et Cham. en la cuenca del río Angulo, Michoacán. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 1(2), 31-38.
- Moreno, G. S. (1985). Variación en características de conos y semillas el *Pinus leiophylla* Scl. Et Cham de 11 poblaciones naturales del centro del país. Tesis de Licenciatura, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México. 59 p.
- Muñoz, F. H. J., Prieto, R. J. A., Flores, G. A., Pineda, O. T., & Morales, G. E. (2013). Técnicas de injertado “enchapado lateral” y “fisura terminal” en *Pinus pseudostrobus* Lindl. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias [INIFAP]. Folleto técnico No. 6. 48 p.
- Niemi, K., Scagel C., & Häggman H. (2007). Application of ectomycorrhizal fungi in vegetative propagation of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 78, 83–91.
- Parasharami, V. A., Poonawala, I. S., & Nadgouda, R. S. (2003). Bud break and plantlet regeneration *in vitro* from mature trees of *Pinus roxburghii* Sarg. *Current Science-Bangalore*, 84(2), 203-207.

- Perry, Jr. P. J. (1991). *The Pines of Mexico and Central America*. Oregon, EUA: Timber Press. 231 p.
- Rodríguez-Banderas, A., Vargas-Mendoza, C. F., Buonamici, A., & Vendramin, G. G. (2009). Genetic diversity and phylogeographic analysis of *Pinus leiophylla*: a post-glacial range expansion. *Journal of biogeography*, 36(9), 1807-1820.
- Rodríguez-Franco, C. (2002). *Pinus leiophylla* Schtdl. & Cham. In: CAB international (ed) Pines of silvicultural importance (pp. 202-205). CABI publishing, Wallingford.
- Rodríguez, J. L., Valledor, L., Hasbún, R., Sánchez, P., Rodríguez, R., & Cañal, M. J. (2015). The Effects of Hormone Treatment on Epigenetic Marks during Organogenesis in *Pinus radiata* D. Don Embryos. *Journal of plant growth regulation*, 35(1), 97-108.
- Ruíz, M. P. (1985). *Propagación por dos técnicas de injertado en Pinus michoacana Mtz.* Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. De México, México.
- Sáenz, R. C., Rehfeldt, E. G., Ortega, R. J. M., Marín, T. M. C., & Madrigal, S. X. (2015). *Pinus leiophylla* suitable habitat for 1961-1990 and future climate. *Botanica Sciences*. 93(4), 709-718.
- Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT]. (2013). *La producción de resina de pino en México: Autor y CONAFOR.* pp. 15. Obtenido de <http://bibliotecasibe.ecosur.mx/sibe/book/000054587>.
- Selby, C., Watson, S., & Harvey, B. M. (2005). Morphogenesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) bud cultures—tree maturation and explants from epicormic shoots. *Plant cell, tissue and organ culture*, 83(3), 279-285.
- Servicio Meteorológico Nacional. (2010). Normales climatológicas. Estación 00015170, Chapingo (DGE). Obtenido de <http://smn1.conagua.gob.mx>
- Stojičić, D., Janošević, D., Uzelac, B., Čokeša, V., & Budimir, S. (2012). Micropropagation of *Pinus peuce*. *Biología plantarum*, 56(2), 362-364.
- Vargas, H. J. J., Jasso, M. J. & Bermejo, V. B. (2004). El mejoramiento genético forestal como base para el establecimiento de plantaciones forestales. In Arteaga, M. B., & Musalem S. M. A. (Eds.), *Plantaciones forestales* (pp. 49-80). Edo. de México, México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Villaseñor, R. R., & Carrera, G. M. S. (1980). Tres ensayos de injerto en *Pinus patula* Schl. et Cham. *Ciencia Forestal*, 5(23), 21-36.
- White, T. L., Adams, W. T., & Neale, B. D. (2007). *Forest Genetics*. Massachusetts, EUA: CBAI. 682 p.
- Wright, W. J. (1976). *Introduction to Forest Genetics*. California, EUA: Academic Press. pp. 463.
- Zhu, L. H., Wu, X. Q., Qu, H. Y., Ji, J., & Ye, J. R. (2010). Micropropagation of *Pinus massoniana* and mycorrhiza formation *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 102(1), 121-128.
- Zobel, B., & Talbert, J. (1988). *Técnicas de Mejoramiento Genético de árboles forestales*. México D. F.: Limusa. 545 p.

CAPITULO II: CLONACIÓN POR INJERTO DE ÁRBOLES MADUROS DE *Pinus leiophylla* DE UN HUERTO SEMILLERO SEXUAL

2.1. RESUMEN

Los injertos son una alternativa de clonación para árboles en la fase adulta que presentan baja o nula capacidad de desarrollo de raíces adventicias. Esta técnica se aplicó a 4 árboles seleccionados de más de 28 años de edad de un huerto semillero sexual para ser propagados vegetativamente, por ser putativamente resistentes a una plaga chupadora del follaje y ser algunos de los mejores productores de semilla del huerto. Se probó el genotipo, edad del patrón, estado de desarrollo de la púa y la técnica de injerto por considerar que tienen un efecto en el éxito del injerto (PI) y crecimiento en longitud del injerto (CLI).

Después de 60 días, el PI varió de manera significativa ($p \leq 0.05$) según el genotipo, la edad del patrón y el tipo de injerto. El genotipo 51 obtuvo el mayor PI con 57.2 %, mientras el peor resultó ser el 168 con solo 29.4 %. Los patrones de 1 año tuvieron el mayor PI con 59.2 %, comparado con los de 2 y 4 años con 52.1 y 31.3 %, respectivamente. El estado de desarrollo de la púa no tuvo efecto significativo; sin embargo, el “estado 1” mostró un porcentaje mayor de PI de 51.9 % comparado con el “estado 2” con 43.1 %. La posición del injerto lateral (L1 y L2) mejoró el PI en 53.8 % y 45.8 %, respectivamente, en contraste con los terminales 42.9 %. Los cuatro factores probados mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la variable de CLI a los 120 días. El mayor crecimiento se presentó en el genotipo 34 con 15.6 cm, en patrones de 2 años con 14.9 cm, en el “estado 1” de desarrollo de la púa con 13 cm e injerto terminal 16.3 cm. Los resultados indican que, hay un efecto del genotipo, edad del patrón y tipo de injerto en las dos variables evaluadas (PI y CLI).

Palabras clave: Clonación, crecimiento, injerto, púa, patrón.

CLONING BY GRAFT OF MATURE *Pinus leiophylla* TREES FROM A SEXUAL SEED ORCHARD

2.2. ABSTRACT

Grafts are an alternative cloning in mature trees, which have little or no ability to develop adventitious roots. This technique was applied to 4 selected trees over 28 years old from a sexual seed orchard for its vegetative propagation, these were putatively resistant to a foliage sucking plague and because these are some the best seed producers from orchard. Genotype, rootstock age, scion development state and graft technique were tested by considering that these have an effect in graft success (GS) and growth length graft (GLG).

After 60 days, the GS significantly varied ($p \leq 0.05$) according to genotype, rootstock age and graft type. Genotype 51 obtained the highest GS with 57.2 %, while 168 was worst with only 29.4 %. The 1 year old rootstocks had the highest GS with 59.2 %, compared to those of 2 and 4 years old rootstocks with 52.1 and 31.3 %, respectively. Scion development state did not have significant effect; however, “state 1” showed a higher percentage of GS 51.59 % compared to “state 2” with 43.1 %. The position of the lateral graft (L1 and L2) improved GS 53.8 % and 45.8 %, respectively in contrast to the terminal grafts 42.9 %. Four tested factors showed significant difference ($p \leq 0.05$) in the GLG variable at 120 days. The largest growth was presented in genotype 34 with 15.6 cm, 2 years old rootstocks with 14.9 cm. Scion development “state 1” with 13 cm and terminal graft with 16.3 cm. The results indicate that there is an effect of genotype, rootstock age and graft type in the two variables evaluated (GS and GLG).

Keywords: Cloning, growth, graft, scion, rootstock.

2.3. INTRODUCCIÓN

Pinus leiophylla es un árbol entre 25-30 m de altura, presenta un amplio rango de distribución, desde Chihuahua hasta Oaxaca de los 1600 a 3000 m de altitud (Eguiluz, 1978; Perry, 1991). Es la segunda especie de mayor importancia en la producción de resina en México (SEMARNAT, 2013); sin embargo, su mayor importancia es ecológica, a nivel mundial se han establecido plantaciones experimentales para controlar la erosión (Dvorak et al., 2007; Rodríguez-Franco, 2002). Bajo condiciones experimentales la especie ha mostrado tolerancia a factores adversos como el estrés hídrico (Castelán, 2014; Martínez et al., 2002), condiciones de anegamiento (Hernández, 2016) y altos niveles de salinidad en el suelo (Jiménez & Zwiazek, 2014). Además, presenta una gran capacidad para sobrevivir a incendios de mediana intensidad, suelos pobres (Perry, 1991), y tiene gran habilidad de colonización (Rodríguez-Banderas et al., 2009); por ello es una especie a considerar fuertemente para la generación de germoplasma altamente tolerante a factores adversos por hibridación geográfica. Ya que además en las últimas décadas las poblaciones de *P. leiophylla* localizadas en la región central del país se han reducido o desaparecido debido al cambio de uso del suelo.

Como consecuencia de lo anterior, en 1991 se estableció un huerto semillero sexual (HSS) de *P. leiophylla* con árboles de diversas procedencias del centro del país, con el fin de conservar y generar germoplasma de calidad tolerante a factores adversos para reforestar, restaurar y rehabilitar sitios degradados (Jasso & Jiménez, 1994). En el huerto se han identificado algunos genotipos con buenas características fenotípicas, tolerantes a estrés causado por algunos factores bióticos y abióticos (Jiménez y Jasso, 2011), así como de alta producción de semilla (Gómez et al., 2010). Por ello es necesario contar con suficiente planta de calidad demandada por los programas de reforestación, restauración y rehabilitación de áreas degradadas en la región centro del país. Además, estas plantaciones también podrían tener uso maderable, es necesario estudiar la calidad de madera (poco se conoce de sus propiedades), y proponerla en plantaciones comerciales para producción no solo de resina sino también de madera; ya que es una especie de rápido crecimiento.

Los injertos son una técnica de clonación y son utilizados principalmente para el establecimiento de huertos semilleros clonales ó para preservar genotipos de importancia y perpetuar una característica de interés (Bonga, 2016; White et al., 2007; Zobel & Talbert, 1988). Sin embargo, poco se ha hecho en la clonación de árboles adultos selectos a través de injerto, que por otras vías es difícil su propagación vegetativa por presentar una baja o nula capacidad para desarrollar raíces adventicias (Carrera, 1977; Dhawan & Saxena, 2004). Un caso de éxito en México de un huerto semillero clonal a partir de injerto en coníferas es reportado en Vargas & Vargas (2016).

El injerto está constituido básicamente por dos partes: la púa o injerto que es un brote o yema desprendida de un árbol donador, que al unirse al patrón desarrollará la parte aérea de la nueva planta; entonces el patrón o portainjerto constituye la parte baja de la nueva planta, que es la que recibe y se fusiona con la púa, proporciona el sistema de raíces que proveerá de anclaje, agua y nutrientes para el crecimiento de la púa (Mudge et al., 2009; Wright, 1976). Desde otro punto de vista, un injerto es un sistema de componentes genéticos donde se unen dos o más genotipos, cada uno de los cuales mantiene su propia identidad a través de la vida de la planta injertada (Mudge et al., 2009). La unión entre la púa y el patrón se da cuando los tejidos recién cortados con actividad meristemática y las regiones cambiales son puestos en contacto fijo, las células del cambium expuestas por las heridas producen células de parénquima que forman el tejido de cicatrización llamado callo (Darikova et al., 2011; Hartmann et al., 2011; Pina & Errea, 2005; Pina et al., 2009).

Existen algunas metodologías para la aplicación de la técnica de injerto, así como las actividades posteriores al “prendimiento” (Blada & Panea, 2012; Castaño et al., 2004; Cuevas, 2014; Gil & Pérez, 1986; Hartmann et al., 2011; Macdonald, 2002; Muñoz et al., 2013), las cuales se deben ajustar para *P. leiophylla*, de acuerdo con sus características fenológicas, fisiológicas y morfológicas propias de la especie.

Algunos factores que determinan el éxito o fracaso de los injertos son el genotipo, edad de patrón, estado de desarrollo de la púa y el tipo de injerto, por ello se han hecho algunas investigaciones relacionadas con estos factores en coníferas. Genotipo: Cuevas (2014) con *P. leiophylla*, Medina et al., (2007) en *Pinus elliottii*, Pardos et al., (2003) en *Pinus halepensis* y Haines & Simpson (1994) en *Pinus caribaea*. Edad del patrón: Greenwood et al., (2010) en *Picea Rubens* Sarg. Estado de desarrollo de la púa: Hibbert et al., (2011) y Hibbert et al., (2010)

en *Abies fraseri*. Tipo de injerto: Muñoz et al., (2013) en *Pinus pseudostrobus*, Becerra & Plancarte, (1993) en *Pinus greggii* y Ruíz, (1985) en *Pinus michoacana* Mtz.; por ello es importante probar estos factores para determinar cuál de ellos favorece y podría funcionar para la clonación por injerto de árboles de *P. leiophylla*.

El objetivo de esta investigación es la clonación por injerto de árboles maduros de *P. leiophylla* de un HSS evaluando el efecto de cuatro genotipos (101, 51, 34 y 168), tres diferentes edades de patrón (1, 2 y 4 años), dos estados de desarrollo inicial de la púa denominados (estados 1 y 2) y dos tipos de técnicas de injerto, terminal y lateral, éste a dos diferentes alturas (15-20 y 5-10 cm a partir de la base) sobre el prendimiento y crecimiento en longitud del injerto.

La hipótesis planteada, es que los factores antes citados determinan el éxito o fracaso en el prendimiento y crecimiento en longitud de los injertos en *P. leiophylla*.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

De un HSS de *P. leiophylla* establecido en 1991 en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en las coordenadas geográficas 19° 27'34.8" LN y 98° 54'15.8" LO con precipitación media anual de 559 mm (Gómez et al., 2010), se seleccionaron 4 árboles adultos de más de 28 años de edad para su clonación por injerto (101, 51, 34 y 168) (Cuadro 1). La selección en orden de importancia se basó en: la sobrevivencia a la plaga chupadora del follaje *Toumeyella pinicola* Ferris, algunos de los mejores árboles productores de semilla dentro del huerto, buenas características fenotípicas bajo las condiciones adversas del sitio de plantación (alta salinidad) y libres de plagas y enfermedades aparentes.

Cuadro 1. Procedencia de los árboles seleccionados de *P. leiophylla* para su clonación por injerto de un huerto semillero sexual (HSS).

Árbol (HSS)	Procedencia	Latitud N	Longitud W	Altitud (m)	pp (mm)
101	Tlalmanalco, Edo. de México	19° 11'	98° 47'	2250	1027
51	San Juan Tetla, Puebla	19° 15'	98° 32'	2550	1160
34	Tlamacas, Puebla	19° 03'	98 ° 40'	2550	1186
168	Santa María Atepatzingo, Puebla	19° 20'	98° 31'	2500	950

2.4.1. Características de las púas

De los 4 árboles seleccionados se recolectaron las púas en el periodo de la segunda semana del mes de marzo y la primera semana del mes de abril de 2016, periodo en el que las yemas apicales salieron de su dormancia e iniciaron el alargamiento del brote de acuerdo a su ciclo anual de crecimiento. Al momento de la recolecta las púas tuvieron dos diferentes estados de desarrollo, a las que se determinaron como: “estado 1” y “estado 2”.

Las púas “estado 1”, son aquellas yemas terminales que al salir de su etapa de dormancia tuvieron un primer crecimiento y que a partir de la segunda semana del mes de marzo alcanzaron 3.7 cm en promedio de longitud, así permanecieron algunos días previo a continuar su alargamiento anual. En este estado de manera externa las púas presentan sus escamas cerradas, compactas de color amarillo oscuro en la base tornándose verde claro hacia la punta, con

presencia de residuos de resina y sin acículas; de manera interna, suculentas, sin lignificación aparente, de color verde más oscuro hacia la parte externa y disminuyendo su coloración hacia la parte interna de su eje vertical, en la punta con el domo apical y sus primordios florales (Figura 1). La longitud y diámetro promedio de las yemas para cada uno de los cuatro árboles se muestran en el Cuadro 2, aunque son de la misma especie, cada árbol presenta particulares hábitos de crecimiento en sus yemas por ser de diferentes procedencias.

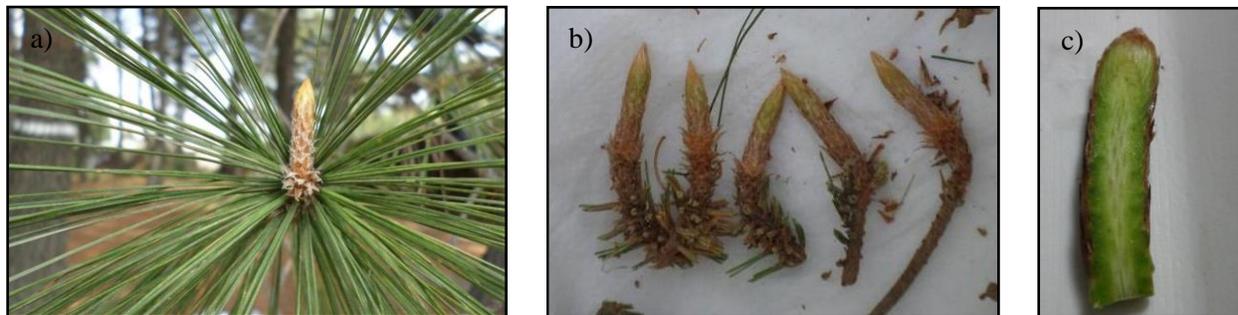


Figura 1. Estado de desarrollo de las púas de *P. leiophylla* denominadas “estado 1”. a) púa antes de recolecta, b) púas recolectadas, c) corte longitudinal en la parte central de la púa.

Aproximadamente dos semanas después del estado antes descrito se obtuvo el segundo estado de desarrollo de las púas que se probó en esta investigación, denominadas “estado 2”, que correspondió a los primeros días de abril de 2016. Estas mostraban 6.5 cm de longitud y al exterior un color verde claro en la base y tornándose café en la punta, rígidas y erguidas, ya no presentaban escamas, se estaban formando los fascículos, pero sin presentar todavía acículas; de manera interna suculentas, sin lignificación aparente, de color verde claro, en la punta con un domo apical y sus primordios florales (Figura 2). La longitud y diámetro promedio de las púas por árbol se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Longitud y diámetro (\emptyset) promedio y desviación estándar ($n= 90$) de las púas de *P. leiophylla* por árbol usadas en los injertos, para los estados de desarrollo E1 y E2.

Árbol	E 1		E 2	
	Longitud púa (cm)	\emptyset púa (mm)	Longitud púa (cm)	\emptyset púa (mm)
101	4.06±0.81	4.60±0.72	6.56±0.85	4.34±0.92
51	3.82±0.58	5.14±0.90	6.84±0.82	5.93±1.78
34	4.22±0.68	5.15±1.14	6.52±0.95	4.77±1.13
168	2.76±0.47	4.73±0.69	6.19±0.97	3.98±0.79

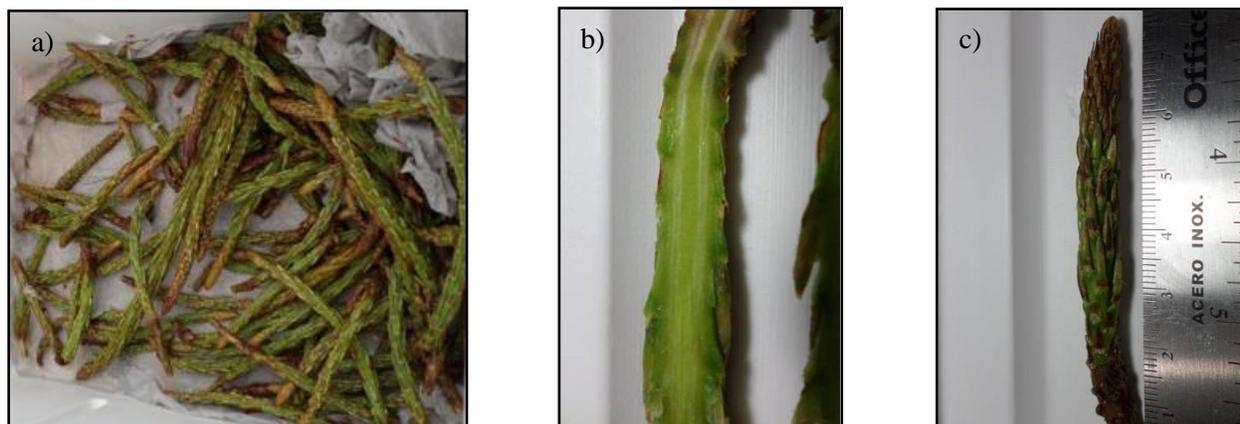


Figura 2. Estado de desarrollo de las púas de *P. leiophylla* denominadas “estado 2”. a) púas colectadas, b) corte longitudinal en la parte central de la púa, c) longitud de púa.

2.4.2. Recolecta de las púas

Las púas se recolectaron del árbol madre de las ramas del primer tercio de la copa con tijeras de podar con extensión y solo se recolectaron las que iban a ser injertadas ese mismo día (Figura 3). Cada día se recolectaban aproximadamente 120 púas, de las cuales se seleccionaban solo las mejores 90, a cada púa se les hizo un corte a la altura de su base para quedarse con la parte de interés; posteriormente se lavaron en un recipiente plástico en una solución llevada a un litro con jabón de polvo comercial y cloro (hipoclorito de sodio 4-6 %) diluido al 10 % con agua corriente, se agitaron manualmente hasta quitar la resina y polvo que contenían; enseguida se enjuagaron con agua corriente para después colocarlas en una solución con captan® 2 g L⁻¹ de agua durante 20 minutos con el fin de evitar problemas fitosanitarios posteriores; finalmente se colocaron en una hielera, asperjándolas constantemente a lo largo del día mientras se realizaban las actividades de injertado, esto para mantenerlas húmedas y frescas y con ello evitar su deshidratación.



Figura 3. Colecta de púas de árboles maduros de *P. leiophylla* para su posterior injertado. a) recolección de púas, b) lavado y enjuague, c) inmersión en fungicida, d) colocación en hielera.

2.4.3. Características de la planta patrón

Se utilizaron patrones de planta correspondientes a 1, 2 y 4 años de edad con procedencia del Estado de México y seis meses antes de realizar los injertos, toda la planta patrón, independientemente de su edad, se trasplantó en condiciones homogéneas a bolsa de polietileno negra de 4.5 litros con una mezcla de sustrato de turba (Kekila[®]), tierra negra, perlita (agrolita[®]) y vermiculita[®] en una proporción 70-10-10-10, respectivamente, adicionándole 5 g L⁻¹ de fertilizante de liberación controlada de 8-9 meses de acción (osmocote[®]) con la fórmula 15-9-12. El riego y fertilización se aplicaron juntos a la planta patrón una vez por semana ½ litro por planta con fertilizante soluble Peters professional[®] 4-25-35 diluido 1 g L⁻¹ de agua.

Al momento de realizar los injertos en el mes de marzo, los patrones presentaban el inicio del crecimiento en las yemas terminales, que coincidía con la fenología de los árboles donadores de las púas, al salir del periodo de dormancia de acuerdo con su ciclo anual de crecimiento. La longitud total y diámetro en el punto de unión del patrón para las tres diferentes edades se muestran en el Cuadro 3.

Al momento de injertar los patrones de un año presentaban hojas secundarias dispuestas en fascículos, corteza y tallo suaves al corte, con una yema terminal con dominancia apical bien definida, baja densidad de follaje y sistema de raíces en desarrollo; aunque ya con raíces primarias, secundarias y pelos radiculares; mientras que los de dos años presentaban hojas secundarias dispuestas en fascículos, corteza y tallo suaves al corte, todavía no formaba una corteza gruesa, con una yema terminal, pero en la mayoría de los casos empezando a competir con ella las yemas de las ramas del verticilo inmediato inferior, follaje denso y un sistema de raíces bien desarrollado; y los de cuatro años presentaban hojas secundarias dispuestas en fascículos, corteza y tallo con mayor resistencia al corte, ya que la corteza se encontraba más gruesa y leñosa, con poco follaje en la copa en comparación con las otras dos edades del patrón, la mayoría no presentaba una yema con dominancia bien definida, por lo que se seleccionó la más adecuada para realizar el injerto en ella (Figura 4).

Cuadro 3. Promedio y desviación estándar de longitud total y diámetro (\emptyset) en el punto de unión para cada edad del patrón utilizado al momento de realizar el injerto.

Característica	n	Edad (año)		
		1	2	4
Longitud total (cm)	240	48.7±7.74	86.0±14.82	94.9±14.27
\emptyset (mm) injertos terminales	80	4.9±00.83	7.3±01.76	5.5±01.09
\emptyset (mm) en injertos laterales 5-10 cm	80	5.1±00.76	10.6±02.19	10.4±01.55
\emptyset (mm) injertos laterales 15-20 cm	80	4.9±00.78	9.8±01.85	9.4±01.78

Nota: La longitud total se midió desde la base donde inicia el tallo, hasta la punta superior donde termina la yema; \emptyset = diámetro del tallo del patrón; n= número de muestra.



Figura 4. Patrones para injerto de *P. leiophylla*. a) 1 año, b) 2 años y c) 4 años.

2.4.4. Injertado

Los injertos se realizaron a partir de la segunda semana del mes de marzo de 2016, cuando las yemas terminales de ramas comenzaban su etapa de crecimiento anual. Primero se injertaron los tratamientos correspondientes a las púas en el “estado 1” y aproximadamente dos semanas después se injertaron los tratamientos de las púas en “estado 2”. El calendario de injertado se muestra en el Cuadro 4.

En el experimento se realizaron 720 injertos en total, aproximadamente 90 injertos por día, en un tiempo aproximado de 4-6 minutos para cada uno. Los injertos se realizaron por 2 injertadores, haciendo la mitad de las repeticiones por tratamiento cada injertador para evitar sesgo en los resultados. Se probaron dos técnicas de injertado: 1) fisura terminal y 2) enchapado lateral, este a dos diferentes alturas (5-10 y 15-20 cm) a partir de la base.

Antes de realizar cada injerto, se efectuó una desinfección de las herramientas de disección (tijeras de podar, cúters y bisturís), así como las manos de los injertadores con etanol diluido al 70 %, para evitar problemas fitosanitarios.

Cuadro 4. Calendario de injertado para *P. leiophylla*.

Árbol	Fecha de injertado	Estado de la Púa
101	17 de marzo de 2016	
51	18 de marzo de 2016	<i>“estado 1”</i>
34	19 de marzo de 2016	
168	29 de marzo de 2016	
101	30 de marzo de 2016	
51	31 de marzo de 2016	<i>“estado 2”</i>
34	2 de abril de 2016	
168	7 de abril de 2016	

2.4.5. Técnica de injerto terminal

En la técnica de injerto terminal, primero se hizo la decapitación del tallo principal del patrón con tijeras de podar, haciendo un solo corte firme y continuo sin dañar la parte baja, que es donde se llevó a cabo la unión del injerto. Se presentaron 2 casos: 1) Los patrones que presentaban su yema terminal dominante, en este caso el corte se hizo en la base de la yema terminal entre la región lignificada con la que no lo está por encima del último verticilo y 2) Las ramas del último verticilo presentaban dominancia sobre la apical, en este caso se hacía la decapitación en la parte inmediata inferior del último verticilo, esto en los patrones de 2 y 4 años, ya que los de un año aún no han desarrollado verticilos y no se presentó esta situación.

Posteriormente a partir del punto donde se hizo la decapitación y 5 cm hacia abajo, se quitaron las acículas y se limpió la superficie del tallo con una gasa con etanol diluido al 70 % para tratar de favorecer las condiciones asépticas en el área superficial de la unión del injerto (Figura 5a); entonces a partir de la punta del tallo del patrón hacia abajo, se hizo un corte vertical en la parte central de 2.5 cm con una navaja cúter (1.8 x 10 cm), que es la hendidura donde se colocó la púa (Figura 5b); posteriormente, de la hielera se tomó la púa previamente preparada y se le realizó un corte en la base de forma transversal al eje principal de la yema con bisturí No. 21 sobre un trozo de madera, para separar la parte de la ramilla lignificada del último crecimiento con la parte no lignificada y suculenta del nuevo crecimiento (Figura 5c); posteriormente se hicieron dos cortes

continuos opuestos en la base de la púa en forma de bisel (cuña) aproximadamente de 2 cm con un bisturí No. 12 tratando de obtener una superficie sin curvaturas con un solo plano en ambos lados y dejando a la vista el cambium (Figura 5d); luego se colocó la púa hasta el final de la hendidura previamente hecha en el tallo principal del patrón, esto con el fin de evitar espacios vacíos y favorecer una conexión continua del cambium, donde lo más importante es hacer coincidir el cambium de ambas estructuras (púa y patrón), pero como generalmente el diámetro de la púa era menor que el del patrón se corrió hacia una parte cambial del diámetro (Figura 5e). Por otro lado, el corte de la hendidura en el patrón es más largo, por lo tanto sobresalieron las caras de este por encima de las caras hechas en la púa, por si se presentara deshidratación en el patrón, no afectara al injerto (Figura 5b y e).



Figura 5. Etapas de la técnica de injerto terminal realizado en *P. leiophylla*. a) decapitación, b) hendidura, c) corte de la base de la púa, d) corte en bisel, e) union del injerto, f) recubrimiento plástico, g) colocación de bolsa.

Una vez concluido lo anterior, se llevó a cabo un recubrimiento con una cinta (hule cristal de 1 cm de ancho) para favorecer la unión de ambas estructuras, haciendo una presión firme y continua comenzando de la parte baja unos 3 cm antes del empalme de la púa con el patrón, haciendo el recubrimiento helicoidalmente hacia arriba sin dejar espacios descubiertos, hasta llegar a la parte donde termina el empalme de las 2 estructuras; posteriormente, se hizo el amarre y corte de la cinta, este recubrimiento principalmente es para cubrir herméticamente y evitar la deshidratación del punto de unión (Figura 5f). Finalmente, se colocó una bolsa plástica cubriendo al injerto para proporcionar las condiciones adecuadas de temperatura y humedad

ambiental requeridas alrededor del injerto, evitando su deshidratación por efectos del viento, o también evitar excesos de humedad en el punto de unión por la caída del riego (Figura 5g).

2.4.6. Técnica de injerto lateral

Básicamente es la misma técnica utilizada en injertos terminales, solo que, en lugar de hacer la decapitación del patrón, se hace un corte con cierto grado de inclinación sin llegar al centro del tallo, dejando una lengüeta, ya que es entre estas dos partes donde se colocó la púa, este corte se hace en la base del tallo principal del patrón, dependiendo del tratamiento que se trate, de 15-20 cm (L1) ó 5-10 cm (L2) a partir de la base. El corte de la púa, el recubrimiento con plástico y la colocación de la bolsa son iguales que para el injerto terminal antes descrito (Figura 6).

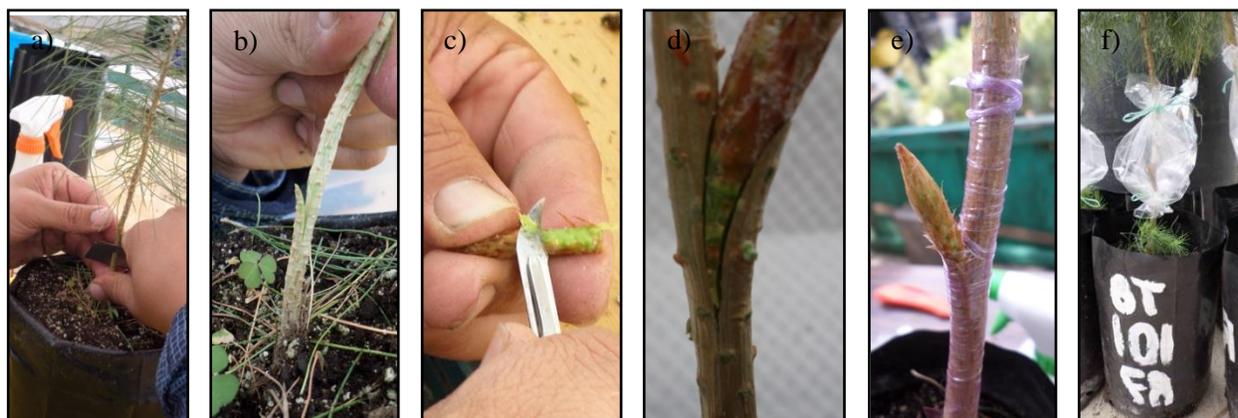


Figura 6. Etapas en injerto lateral de *P. leiophylla*. a) corte del tallo del patrón, b) hendidura, c) corte en bisel de la púa, d) empalme púa-patrón, e) recubrimiento del punto de unión, f) colocación de la bolsa.

2.4.7. Condiciones ambientales experimentales

El experimento se estableció bajo condiciones de invernadero y sobre éste se colocó una malla sombra al 70 % para reducir la iluminación y temperatura. Se hizo la apertura de las cortinas laterales del invernadero solo quedando las mallas antiáfidos para favorecer la entrada de corrientes de aire. La humedad relativa y la temperatura, máximas y mínimas dentro del invernadero, se registraron diariamente con un equipo “termómetro digital para interior Springfield® con higrómetro”. Durante los 60 días que se evaluó el prendimiento, los promedios de temperatura máximas y mínimas fueron de 34.6 y 12.2 °C, respectivamente y la humedad relativa máxima y mínima de 83.1 y 21.5 %, respectivamente (Figura 7).



Figura 7. Condiciones ambientales experimentales. a) invernadero con malla sombra, b) condiciones internas del invernadero, c) medición de temperatura y humedad relativa.

2.4.8. Fertilización y riego

La fertilización de patrones se aplicó junto con el riego $\frac{1}{2}$ litro por planta de fertilizante hidrosoluble una vez por semana. Una semana anterior a realizar los injertos se aplicó el fertilizante Peters professional[®] (20-20-20) aplicando 1.5 g L^{-1} , durante 4 semanas. Las siguientes semanas se aplicó el fertilizante Peters professional[®] pero con la proporción (4-25-35) 1 g L^{-1} , para favorecer la lignificación del injerto.

2.4.9. Variables a evaluar

2.4.9.1. Prendimiento o éxito del injerto (PI)

Se evaluó a los 60 días después de haber realizado los injertos y se planteó una categorización en tres tipos (Figura 8): a) Injertos “muertos”: aquellas púas que a los 60 días de injertadas se encontraron con su tejido muerto, de color café oscuro, aparentemente no se efectuó la unión funcional del cambium de ambas estructuras, por lo tanto, al patrón no le pudieron subministrar los nutrientes y agua necesarios para continuar su desarrollo. b) Injertos “vivos sin respuesta”: son las púas que a los 60 días se encontraban en las mismas condiciones aparentes, que cuando se injertaron, no tuvieron crecimiento en longitud, pero tampoco se encontraban muertas; por lo tanto, al existir incertidumbre en su prendimiento, ya que posiblemente solo se mantenían vivas por sus reservas propias no se consideraron como injertos prendidos. c) Injertos “vivos con respuesta”: Debido a que se quería conservar el material injertado no se hizo un análisis destructivo de anatomía interna del callo para determinar su unión, más bien para definir esta categoría fue basada en aspectos morfológicos superficiales; son aquellas púas que, a los 60 días

de injertadas, presentaban por lo menos 2 cm de crecimiento de su longitud inicial o mostraban indicios de continuar con su desarrollo al observarse crecimiento de las nuevas acículas. Esta última categoría (vivos con respuesta) solamente es la que se consideró como injertos prendidos o exitosos.

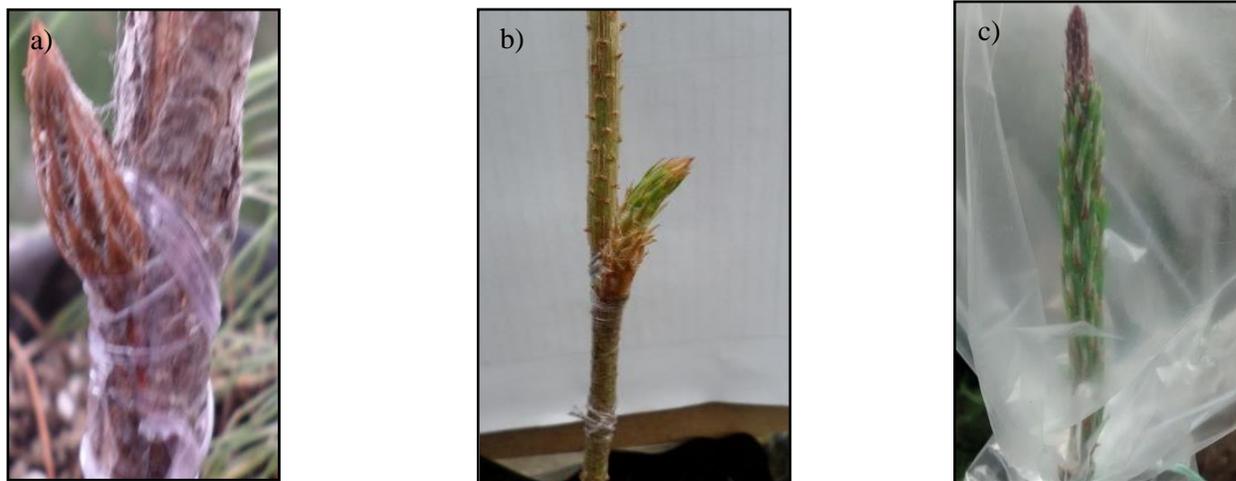


Figura 8. Categorías de prendimiento en los injertos de *P. leiophylla* después de 60 días de injertado. a) “muerto”, b) “vivo sin respuesta”, c) “vivo con respuesta”.

Supervivencia del injerto

La supervivencia se evaluó solamente para los injertos denominados “vivos con respuesta” en el periodo del día 61 al 240 después del injertado, realizando la toma de datos a los 60, 90, 120 y 240 días, registrando las causas de muerte del injerto: a) aparente incompatibilidad entre las partes del injerto, b) muerte del patrón por problemas fitosanitarios causados por hongos en sus raíces, c) daño mecánico por ruptura de la púa injertada, d) pudrición en el punto de unión y e) punta de la púa muerta.

2.4.9.2. Crecimiento en longitud del injerto (CLI)

Para esta variable se hizo una medición inicial de la longitud de la púa al momento de realizar los injertos y otras a los 60, 90 y 120 días, para determinar el crecimiento de la variable solo para la categoría “vivos con respuesta”; sin embargo, para esa misma variable no se consideró la evaluación a los 240 días, debido a la alta mortalidad de los injertos que no permitieron los análisis estadísticos correspondientes. Para que las mediciones fueran más precisas se les puso a las púas un punto de referencia para que cada medición se realizara en el mismo lugar.

2.4.10. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial de 4x3x2x3: cuatro genotipos (101, 51, 34 y 168), tres edades de patrón (1, 2 y 4 años), dos estados de desarrollo de la púa (“estados 1 y 2”) y tres tipos de injerto (terminal y lateral con dos diferentes alturas a partir de la base 5-10 y 15-20 cm) con 10 repeticiones por tratamiento. Los datos de la variable de porcentaje de prendimiento al no cumplir con los supuestos de normalidad, antes de realizar el análisis de varianza de esta variable (Y) se transformó con la función arcoseno de la raíz cuadrada del valor original expresado en fracción decimal [$T = \arcseno(\sqrt{Y})$]. Posteriormente se hizo el análisis de varianza y seguido de esto los valores promedio de la variable porcentaje se transformaron nuevamente a las unidades originales con la función [$Y = 100 \text{ seno}^2(T)$] y se hizo una comparación múltiple de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), en el programa estadístico (Statistical Analysis System 9.00 [SAS, 2002]) (Cuevas et al., 2015). El modelo estadístico utilizado fue factorial de 4 factores:

$$y_{ijklm} = \mu + A_i + B_j + C_k + D_l + AB_{ij} + AC_{ik} + AD_{il} + BC_{jk} + BD_{jl} + CD_{kl} + ABC_{ijk} + ABCD_{ijkl} + \epsilon_{ijklm}$$

$i = 1, 2, \dots$, a número de niveles del factor A.

$j = 1, 2, \dots$, b número de niveles del factor B.

$k = 1, 2, \dots$, c número de niveles del factor C.

$l = 1, 2, \dots$, d número de niveles del factor D.

$m = 1, 2, \dots$, r número de repeticiones de cada combinación posible.

y_{ijklm} = valor **variable respuesta** de la repetición l del nivel i de A, nivel j de B, nivel k de C y nivel l de D.

μ = media general.

A_i = efecto del nivel i del **factor A (genotipo)**,

B_j = efecto del nivel j del **factor B (edad del patrón)**,

C_k = efecto del nivel k del **factor C (estado de desarrollo inicial de la púa)**,

D_l = efecto del nivel l del **factor D (tipo de injerto)**,

AB_{ij} = interacción A*B, correspondiente al nivel i de A y nivel j de B,

AC_{ik} = interacción A*C, correspondiente al nivel i de A y nivel k de C,

AD_{il} = interacción A*D, correspondiente al nivel i de A y nivel l de D,

BC_{jk} = interacción B*C, correspondiente al nivel j de B y nivel k de C,

BD_{jl} = interacción B*D, correspondiente al nivel j de B y nivel l de D,

CD_{kl} = interacción C*D, correspondiente al nivel k de C y nivel l de D,

ABC_{ijk} = interacción A*B*C, correspondiente al nivel i de A, nivel j de B y nivel k de C,

$ABCD_{ijkl}$ = interacción A*B*C*D, correspondiente al nivel i de A, nivel j de B, nivel k de C y nivel l de D,

ϵ_{ijklm} = error experimental correspondiente a la repetición m del nivel i de A, j de B, k de C y l de D.

2.4.11. Actividades posteriores al prendimiento

Las actividades posteriores al prendimiento de los injertos son tan importantes como la adecuada aplicación de la técnica, ya que si no se llevan a cabo correctamente, los injertos exitosos pueden morir en los siguientes días (Hartmann et al., 2011).

1) El retiro de bolsa plástica en injertos de *P. leiophylla* se realizó entre los 30-60 días posteriores al injertado, dependiendo de la respuesta de la púa para iniciar el desarrollo de acículas, ya que por efecto de la transpiración genera humedad y favorece problemas fitosanitarios (Figura 9a y b). Considerando que la temperatura y humedad exterior comienzan a no ser tan decisivas sobre el injerto cuando el patrón aporta a la púa las sustancias necesarias, además la temperatura debe mantenerse alta para favorecer la diferenciación celular, pero sin llegar a ser desecante y genere un calentamiento excesivo en la zona del injerto (Castaño et al., 2004; Gil & Pérez, 1986).

2) El retiro de plástico en el punto de unión en los injertos de *P. leiophylla* se realizó a los 75 días de injertadas las púas (Figura 9), en *Pinus pinea* y *Pinus sylvestris* lo retiraron entre los 30 y 60 días, al considerar que ya había prendimiento y las heridas ya estaban cicatrizadas (Castaño et al., 2004; Vanderklein et al., 2007). En injertos de *Pseudotsuga menziesii* se observó que todo el sistema de tejidos necesarios para la unión exitosa se presentó a los 35 días (Copes, 1969).



Figura 9. Retiro de bolsa y recubrimiento en injertos de *P. leiophylla*. a) y b) retiro de la bolsa, c) y d) retiro del recubrimiento y e) aplicación de cera en fisuras.

3) La poda en patrones para la liberación del injerto se realizó a los 75 días, tanto en terminales como laterales, con el fin de favorecer su crecimiento. En injertos terminales, para proporcionar una posición de dominancia del injerto con respecto al resto de la copa y tratando de no descompensar la proporción del sistema de raíces con el aéreo, se recortaron las ramas más convenientes en cada caso y se podaron los rebrotes en la parte basal del tallo del patrón,

característicos de la especie. En injertos laterales, debido a que se conservó toda la parte aérea del patrón para realizar las actividades de fotosíntesis y transpiración, mientras el injerto se desarrollaba, la poda se hizo en tres etapas (1/3 cada 15 días), quedando solamente 15 cm del tallo del patrón (Figura 10).



Figura 10. Poda de patrón en injertos de *P. leiophylla*. a) competencia de rebrote, b) competencia de ramas en injerto terminal, c) patrón podado injerto terminal, d) estructura aérea a podar en injertos laterales, e) patrón podado injerto lateral.

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1. Prendimiento de injertos

A los 60 días de haber realizado los injertos, en general para todo el experimento (720 injertos) en la categoría de injerto “vivo con respuesta”, “vivo sin respuesta” y “muerto”, se obtuvieron 47.5 %, 3.75 % y 48.75 %, respectivamente. De los injertos “vivos con repuesta” correspondientes a los injertos considerados como prendidos, tres de los factores probados (genotipo, edad del patrón y tipo de injerto), así como algunas de sus interacciones mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en el prendimiento de los injertos (PI) de *P. leiophylla*; mientras que el factor púa en esa misma categoría no presentó diferencias significativas (Cuadro 5). El periodo de 60 días que se definió para evaluar el PI, se determinó en base a lo mencionado por Muñoz et al. (2013) que indican que la formación de acículas nuevas, estructuras florales, brotación o rompimiento de yemas, se manifiestan a los 2 meses del injertado, lo cual es indicativo de PI. Por su parte en un estudio realizado por Copes (1969) sobre el proceso de la unión de injertos en *Pseudotsuga menziesii* encontró que todos los sistemas de tejido se formaron en los primeros 35 días.

Un factor que favoreció el PI de *P. leiophylla* fue la afinidad de su estructura genética, ya que los injertos intraespecíficos generalmente son más exitosos por tener mayor similitud, anatómica, morfológica y fisiológica entre los componentes del injerto (Darikova et al., 2011; Goldschmidt, 2014; Jayawickrama et al., 1991).

El éxito o fracaso de los injertos de *P. leiophylla* también dependió de factores externos, como la eficiencia en aplicación de la técnica, la protección que se les dio y condiciones ambientales favorables para la formación del callo (McDonald, 2002; Muñoz et al., 2013). Los factores internos están relacionados con la incompatibilidad entre la púa con el patrón (Darikova et al., 2011; Goldschmidt, 2014), que en estudios anatómicos demostraron una conexión vascular pobre o discontinua y una degeneración del floema en el punto de unión (Pina & Errea, 2005; Pina et al., 2009), por su parte Copes (1980), encontró en injertos incompatibles de *Pinus radiata* un engrosamiento anormal del tejido de floema que hace que se desplace el tallo y esto resulta en una alteración del flujo de agua y nutrientes por el xilema (Martínez-Ballesta et al., 2010; Pina et al., 2009), así como este desplazamiento también se puede dar por diferencia en crecimiento radial de la púa con el patrón (Darikova et al., 2011). También una insuficiente unión de

plasmodesmos en las primeras etapas de desarrollo del injerto resulta en incompatibilidad, ya que son canales en la pared celular de las plantas que permiten el paso de macromoléculas y solutos entre células cercanas (Kollmann & Glockmann, 1985; Pina et al., 2009).

Cuadro 5. Valores de significancia de (p) del análisis de varianza de la variable de prendimiento a los 60 días y crecimiento en longitud del injerto a los 60, 90 y 120 días de *P. leiophylla*.

Fuente de variación	GL	Prendimiento	Longitud púa (días)		
			60	90	120
Genotipo	3	0.0001 [†]	<0.0001 [†]	<0.0001 [†]	<0.0001 [†]
Patrón	2	<0.0001 [†]	<0.0001 [†]	0.0002 [†]	<0.0001 [†]
Púa	1	0.0584	<0.0001 [†]	<0.0001 [†]	0.0231 [†]
T injerto	2	0.0182 [†]	<0.0001 [†]	<0.0001 [†]	<0.0001 [†]
Genotipo*Patrón	6	<0.0001 [†]	0.0332 [†]	0.0044 [†]	0.0414 [†]
Genotipo*Púa	3	0.0002 [†]	0.0005 [†]	0.1612	0.1795
Genotipo*T injerto	6	0.3688	0.0132 [†]	0.0157 [†]	0.3169
Patrón*Púa	2	0.0032 [†]	0.9073	0.4046	0.1697
Patrón*T injerto	4	0.2744	0.0064 [†]	0.0051	0.0385 [†]
Púa*T injerto	2	0.6292	0.6029	0.2606	0.1616
Genotipo*Patrón*Púa	6	0.0207 [†]	0.1795	0.6377	0.7071
Genotipo*Púa*T injerto	6	0.3185	0.1741	0.4263	0.3501
Genotipo*Patrón*T injerto	12	0.4641	0.2759	0.7668	0.9783
Patrón*Púa*T injerto	4	0.0497 [†]	0.1707	0.3294	0.5642

[†]= Con diferencia significativa ($p \leq 0.05$). Patrón= edad del patrón; Púa= estado de desarrollo inicial de la púa; T injerto= tipo de injerto; GL= grados de libertad.

2.5.1.1. Efecto del genotipo

Al evaluar el efecto de los 4 diferentes genotipos de *P. leiophylla*, sobre el PI, sus valores promedio del genotipo (51, 34 y 101) mostraron diferencia significativa con respecto al (168). El genotipo (51) obtuvo el mayor prendimiento con 57.2 %, seguido por los genotipos (34) y (101) con 54.4 y 48.9 %, respectivamente, sin embargo, el genotipo (168) presentó el prendimiento más bajo 29.4 % (Cuadro 6). Gil & Pérez (1986) mencionan que el éxito en injertos puede ser muy desigual entre diferentes genotipos, hay genotipos que dan resultados muy buenos, mientras que otros dan resultados notablemente menores.

La diferencia encontrada entre genotipos de *P. leiophylla*, no se atribuye a alguna incapacidad genética interna de las púas para ser injertadas exitosamente, sino más bien, relacionada con las características morfológicas de las púas que produce cada genotipo o produjo en particular esa temporada de crecimiento. De acuerdo con los datos de longitud y diámetro de las púas recolectadas (Cuadro 2), las de menor longitud (estado 1) con 2.76 cm y diámetro (estado 2) con 3.98 mm al momento de realizar los injertos correspondieron al genotipo con menor capacidad de prendimiento (168). Esto indica que el tamaño de la púa es un factor importante para que el injerto tenga un prendimiento exitoso. Para injertos con el género *Pinus* se han recomendado púas de 7.5-10 cm de longitud y 3-6 mm de diámetro (Muñoz et al., 2013; Nienstaedt, 1965), por su parte Ramírez et al. (2007) indican que las características de las púas pueden ser un factor de éxito en los injertos, como en *Fagus grandifolia* con púas mayores a 5 mm de diámetro se obtuvo un 70 % de prendimiento y menores de 5 mm solo el 30 %. El uso de púas pequeñas dificulta la aplicación de la técnica y reduce considerablemente la posibilidad de éxito del injerto (Hallett et al., 1981). Por lo tanto, el tamaño de las púas de *P. leiophylla* del genotipo 168 dificultó en gran medida el PI, probablemente no se favoreció una unión adecuada, por tener una superficie muy pequeña de contacto del cambium con la parte generatriz del patrón.

Las diferencias en las dimensiones de las púas de los genotipos probados pueden relacionarse a su procedencia original (Cuadro 1), ya que no es la misma y por lo tanto tienen diferentes hábitos de crecimiento, en comparación, quizás si fueran genotipos de una misma población, fuera más homogénea la forma de las púas. Algunos estudios con *Pseudotsuga* sp han indicado que los procesos evolutivos en interacción con la heterogeneidad ambiental producen poblaciones adaptadas a sitios específicos, por lo que se pudiera esperar que se presenten diferencias en la morfología de sus yemas (Rodríguez et al., 2006). Sin embargo, Ruíz (1985) no obtuvo diferencias significativas en el PI probando tres genotipos como árboles donadores de púas de *P. michoacana*, atribuyéndoselo a que estos tres genotipos fueron de la misma población. En trabajos posteriores de injertos en *P. leiophylla* se deben estudiar previamente las características morfológicas de las púas que presentan los genotipos de interés.

Cuevas (2014) injertó en invierno púas de 9 genotipos de *P. leiophylla* del mismo huerto semillero sexual que se utilizó para esta investigación, 3 de los 9 genotipos utilizados por el autor antes mencionado fueron probados también para esta investigación (101, 51 y 34), él obtuvo un

prendimiento del 2.0 %, pero al comparar estos resultados con los obtenidos en la presente investigación con 57.2-29.4 % de PI, se puede determinar que no fue efecto del genotipo que influyó en el casi nulo prendimiento en la investigación anterior, sino a otros factores relacionados con el éxito de los injertos.

Cuadro 6. Valor promedio y error estándar para cada factor de los tratamientos probados en el PI (%) a los 60 días y CLI (cm) a los 60, 90 y 120 días de *P. leiophylla*.

Factor	Prendimiento	Longitud púa (días)		
		60	90	120
Genotipo (n= 180)				
101	48.9 ± 0.6 a	4.6 ± 0.4 b	6.3 ± 0.6 c	9.5 ± 1.0 b
51	57.2 ± 1.0 a	5.6 ± 0.3 b	9.0 ± 0.5 b	11.4 ± 0.7 b
34	54.4 ± 0.6 a	7.9 ± 0.5 a	12.2 ± 0.8 a	15.6 ± 1.0 a
168	29.4 ± 0.4 b	4.5 ± 0.6 b	8.6 ± 1.0 b	11.7 ± 1.3 b
Patrón (n= 240)				
1 año	59.2 ± 0.3 a	4.7 ± 0.4 b	8.0 ± 0.6 b	11.0 ± 0.8 b
2 años	52.1 ± 0.6 a	7.3 ± 0.4 a	11.3 ± 0.6 a	14.9 ± 0.8 a
4 años	31.3 ± 0.4 b	5.6 ± 0.5 b	7.8 ± 0.6 b	9.5 ± 0.7 b
Púa (n= 360)				
Estado 1	51.9 ± 0.3 a	6.6 ± 0.4 a	10.4 ± 0.5 a	13.0 ± 0.7 a
Estado 2	43.1 ± 0.4 a	4.8 ± 0.3 b	7.7 ± 0.5 b	11.3 ± 0.7 b
Tipo de injerto (n=240)				
Terminal	42.9 ± 0.5 b	7.8 ± 0.5 a	12.7 ± 0.8 a	16.3 ± 1.1 a
Lateral 15-20 cm (L1)	45.8 ± 0.6 ab	5.1 ± 0.4 b	7.9 ± 0.5 b	10.1 ± 0.7 b
Lateral 5-10 cm (L2)	53.8 ± 0.5 a	4.8 ± 0.3 b	7.7 ± 0.5 b	10.6 ± 0.6 b

Las letras minúsculas diferentes en columnas, indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). Patrón= edad del patrón; Púa= estado de desarrollo de la púa; n= número de muestra.

2.5.1.2. Efecto de la edad del patrón

El PI probando el efecto de la edad del patrón mostró que los de 1 y 2 años no presentan diferencias significativas entre ellos, pero si con los patrones de 4 años (Cuadro 5). El valor promedio de PI fue mayor en patrones de 1 año con 59.2 %, seguido por los de 2 años con 52.1 % y el prendimiento más bajo fue en patrones de 4 años con 31.3 % (Cuadro 6). Barbosa (1984) obtuvo un PI mayor a las tres edades de patrón probados en esta investigación al utilizar patrones de *P. pseudostrobus* de 27 meses de edad obteniendo a los 90 días entre el 66-80 % de prendimiento.

La tendencia de los resultados obtenidos en los injertos de *P. leiophylla* de esta investigación, muestra que el PI va disminuyendo conforme aumenta la edad del patrón, ya que las características morfológicas del patrón van cambiando conforme va aumentando su edad; los tallos de los patrones se van lignificando, empiezan a desarrollar corteza más gruesa y esto dificulta el corte donde se injerta la púa (en injertos laterales); además en los injertos terminales sobre los patrones de 4 años, al no tener una yema dominante, se injertó sobre la rama más viable del último verticilo y esto pudo haber influido en un prendimiento menor.

Pero la edad del patrón no limita completamente el PI, ya que en otras investigaciones en coníferas se han injertado púas sobre patrones de mayor edad y han obtenido porcentajes de prendimiento satisfactorios, como en el caso de Hibbert et al. (2011) que injertaron púas de *Abies fraseri* sobre patrones de 7 años de edad obteniendo a los 105 días un prendimiento de 50-90 %. Greenwood et al. (2010) realizaron injertos en árboles de *Picea rubens* de 12, 53 y 127 años de edad obteniendo en general un 84, 66 y 42 % de PI, respectivamente. Esto permite concluir que se pueden obtener injertos exitosos en árboles de edad muy avanzada siempre que tengan las estructuras adecuadas donde injertar las púas.

Para obtener clones con fines de establecimiento de huertos semilleros asexuales para *P. leiophylla*, se puede recomendar realizar injertos en patrones de 1 a 2 años pero, que cuenten con un sistema radicular abundante, sin daños mecánicos, ni problemas fitosanitarios y equilibrio entre la parte aérea y de raíces como así lo mencionan Gil & Pérez (1986) y Muñoz et al. (2013).

2.5.1.3. Efecto del estado de desarrollo de la púa

No se encontraron diferencias entre los dos estados de la púa probados; sin embargo, el “estado 1” mostró un porcentaje mayor de PI de 51.9 % y “estado 2” 43.1 % (Cuadro 6), no obstante, el “estado 1” es recomendable, por ser más práctico su manejo, particularmente al hacer los cortes en forma de bisel. Cuevas (2014) probó tres diferentes estados de desarrollo de la púa en *P. leiophylla* (enero, abril y julio), todas con la presencia de acículas, obteniendo menos de 3.5 % de PI, menor a los resultados obtenidos en la presente investigación con 43.1 a 51.9 %; se considera que estos resultados más satisfactorios fueron porque las púas presentaban ausencia de acículas, sin aparente lignificación y la época cuando inicia su crecimiento anual y reinicia su actividad celular al salir de la dormancia, a finales de marzo (Taiz & Zeiger, 2002).

Muñoz et al., (2013) en *P. pseudostrobus* recomiendan utilizar púas no elongadas y semilignificadas cuando se rompe la dormancia e inicia la actividad vegetativa. Hibbert et al. (2011) también utilizaron púas cuando están saliendo de la dormancia en injertos de *Abies fraseri* obteniendo del 50 al 90 % de éxito de PI. Castaño et al. (2004) injertaron púas de *P. pinea* en dormancia, logrando un 28.1 % de PI y Hibbert et al. (2010) en *Abies* sp un 95 % de PI y al utilizar púas no durmientes obtuvieron 30 a 55 %; de esta manera no pierden humedad a través de las nuevas acículas, ya que en esta etapa hay una suspensión temporal del crecimiento en los meristemas primarios y la actividad mitótica de las células es muy baja (Castaño et al., 2004; Viveros & Vargas, 2007).

Gil & Pérez (1986) coinciden que se puede utilizar en injertos de pinos, púas en dormancia o al salir de ésta, ya que la actividad de las células de las yemas en esta fase contribuyen a la formación del callo y conexión vascular entre la púa con el patrón, pero en esta fase va siendo menos efectivo el prendimiento de los injertos conforme van sobresaliendo las acículas, ya que va aumentando la demanda de agua y nutrientes que requiere la púa en esta etapa activa de crecimiento y es necesario que la formación del callo y las conexiones vasculares se desarrollen rápidamente (Pallardy, 2008; Taiz & Zeiger, 2002).

2.5.1.4. Efecto del tipo de injerto

El tipo de injerto mostró efecto significativo, los valores promedio muestran que los (L2) correspondiente a injertos laterales entre 5-10 cm fueron superiores en el PI (53.8 %), con respecto a los terminales (42.9 %) y a los L1 (45.8 %) correspondientes a injertos laterales entre 15-20 cm (Cuadro 6). Considerando que los dos tipos de injertos con mayor PI fueron laterales, se pudiera decir que es favorable realizar este tipo de injertos entre 5-20 cm a partir de la base del tallo del patrón; sin embargo, existen algunas desventajas, ya que mientras más cerca a los 5 cm se hagan los injertos laterales, aumenta la dificultad para maniobrar la técnica, así como que se requiere de más cuidado, por tener mayor riesgo de presentar pudrición en el punto de unión, ya que al regar, la humedad entra a la bolsa que cubre al injerto por estar cerca del sustrato.

Los injertos terminales, aunque hayan tenido menor prendimiento, presentan ciertos beneficios: se realizan más rápidamente y son más prácticos, se facilita su mantenimiento (riegos, monitoreos y toma de datos), no requieren de podas para eliminar la parte aérea del patrón después de injertado, pero quizás la más importante es su hábito de crecimiento, donde la púa continúa creciendo de manera inmediata sobre el eje vertical del tallo del patrón.

Cuevas (2014) realizó injertos laterales de *P. leiophylla*, obteniendo menos de 3.5 % de PI, comparando sus resultados con los obtenidos en esta investigación, donde se obtuvieron 45.8 y 53.8 % en (L1) y (L2), respectivamente, se considera que principalmente pudo deberse a dos factores: 1) No se hizo una decapitación completa de la parte aérea del patrón al momento de realizar los injertos, ya que los siguientes autores sugieren que la poda se haga en 3-4 etapas y que la primera por lo menos se realice hasta los 60 días de haber injertado Barbosa (1984), Gil & Pérez (1986) y Muñoz et al. (2013) en *P. pseudostrobus*, Villaseñor & Carrera (1980) en *P. patula* y Vanderklein et al. (2007) en *P. sylvestris*. De esta manera se mantiene la parte aérea del patrón que realiza las funciones de fotosíntesis y transpiración requeridas por la planta, hasta que la púa injertada logre su prendimiento y haya desarrollado hojas secundarias funcionales que puedan sustituir las funciones del follaje del patrón. 2) No adicionar humedad extra a la bolsa que cubre al injerto, para evitar el riesgo de problemas fitosanitarios o pudrición del punto de unión por las altas temperaturas y humedad excesiva.

Para el género *Pinus* las técnicas de injertado más utilizadas son, la terminal y lateral (Blada & Panea, 2011; Gil & Pérez, 1986). En las investigaciones realizadas por Becerra & Plancarte (1993), Hinesley & Frampton (2002) y Muñoz et al. (2013) donde probaron la técnica de injerto terminal en diferentes especies de coníferas, obtuvieron mayor prendimiento (45-100 %), en comparación con los resultados obtenidos en esta investigación para *P. leiophylla* con 42.9 %; por lo tanto, se requiere mejorar la técnica del injerto terminal para esta especie y con ello aumentar el porcentaje de PI como se ha logrado en otras coníferas. Por otro lado, en injertos laterales realizados por, Blada & Panea (2011), Blada & Panea (2012) y Carrera & Villaseñor (1982) obtuvieron un prendimiento entre (30-41 %) menor a lo obtenido para *P. leiophylla* con 45.8 y 53.8 para L1 y L2, respectivamente.

2.5.1.5. Efecto de la interacción entre factores

Se presentaron diferencias significativas en el porcentaje de PI en tres interacciones (Cuadro 5). En la interacción genotipo con la edad del patrón (Figura 11a), se observó que en patrones de 1 y 4 años el mayor PI fue con los genotipos 101 y 34, sin embargo, en patrones de 2 años hubo amplias diferencias, donde el mayor PI fue con los genotipos 51 y 34 bajando al tercer lugar el genotipo 101, generalmente el genotipo 168 obtuvo el menor prendimiento independientemente de la edad del patrón. Esto nos sugiere que pudiera existir alguna mayor compatibilidad en ciertas combinaciones entre el genotipo con la edad del patrón, quizás atribuibles a una afinidad morfológica entre las partes del injerto.

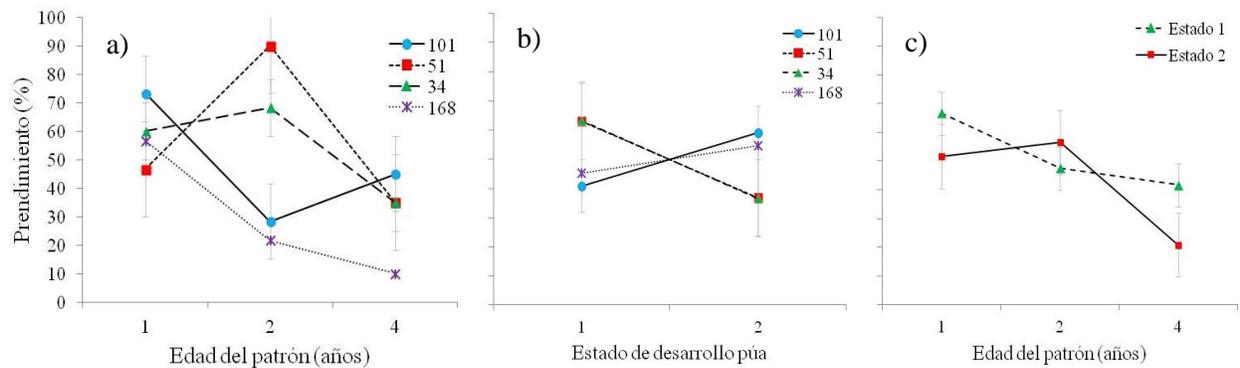


Figura 11. Interacciones con $p \leq 0.05$ para el PI de *P. leiophylla*. a) genotipo-edad del patrón, b) genotipo-estado de desarrollo de la púa, c) edad del patrón-estado de desarrollo de la púa; cada punto representa el promedio con el error estándar.

En la interacción de la Figura 11b, los genotipos (51) y (34) mostraron mayor PI utilizando las púas en el “estado 1” y por lo contrario, para el “estado 2” los genotipos (101) y (168) fueron los que mayor porcentaje de PI presentaron. Quizás como se discutió en la parte del análisis del factor púa, estas afinidades estén relacionadas con sus características morfológicas propias de las púas, donde cada genotipo presenta en algunos casos mejores características para obtener éxito en el injerto en el “estado 1” y otros en el “estado 2”, por lo tanto, puede depender de las características de cada genotipo.

En la interacción de la Figura 11c, los patrones de 1 y 4 años tuvieron mayor PI con púas en el “estado1”, mientras que para los patrones de 2 años presentaron mayor porcentaje de PI con púas en el “estado 2”. Esto indica que existe alguna afinidad entre la edad del patrón con algún estado de desarrollo de la púa, que posiblemente esté influenciado por las características morfológicas que presentan las púas con el patrón y que con ciertas combinaciones favorecen el PI.

2.5.2. Supervivencia de injertos

La supervivencia de los injertos prendidos exitosamente se consideró a partir del día 61-240. De manera general para todo el experimento independientemente de los factores probados, la supervivencia fue disminuyendo de 47.5 a 26.9 % en este periodo (Figura 12) por diferentes causas y que de acuerdo con las evaluaciones se clasificaron en: incompatibilidad (0.57 %), muerte del patrón (82.29 %), daño mecánico (2.29 %), pudrición en el punto de unión (6.86 %) y punta de la púa seca (8.0 %).

Estos resultados muestran que la principal causa de pérdida de injertos no fue incompatibilidad entre la púa con el patrón, sino la “muerte del patrón”(82.29 %), aparentemente causados por problemas fitosanitarios de hongos en sus raíces y a pesar de que no se realizó un estudio para verificar las causas, la sintomatología general presentada en los patrones de *P. leiophylla* coincide con la producida por el hongo *Fusarium oxysporum*, favoreciendo su incidencia por las condiciones en el invernadero donde se encontraban los injertos: alta humedad en el ambiente, temperaturas de medianas a altas y sombra continua durante varios días (Cibrián et al., 2007).

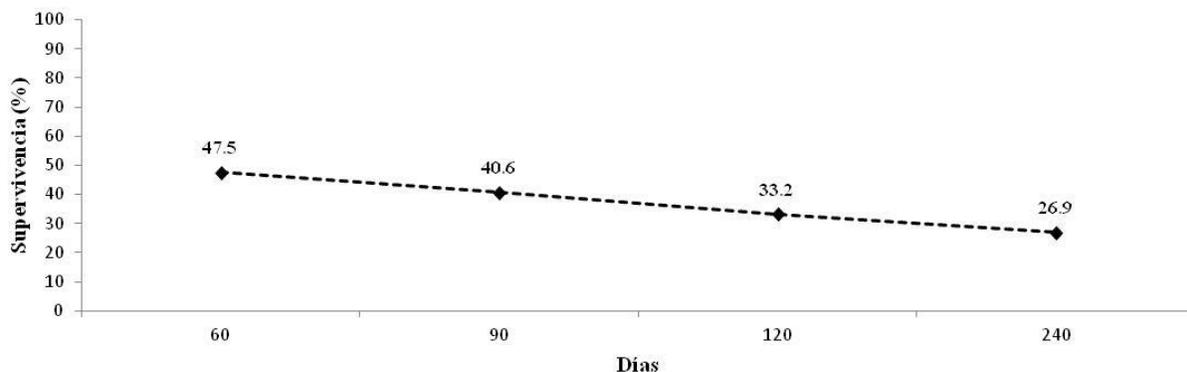


Figura 12. Supervivencia de injertos exitosos de *P. leiophylla* del día 61-240.

En diferentes investigaciones relacionadas con la supervivencia de injertos en coníferas es variante, en algunos casos es mayor, en otras similar o menor (Barbosa, 1984; Medina et al., 2007; Muñoz et al., 2013; Villaseñor & Carrera, 1980), comparándola con los resultados obtenidos para *P. leiophylla*. Sin embargo, se manifiesta la tendencia de ir reduciéndose el número de injertos aparentemente prendidos conforme pasa el tiempo, ocasionada por diversos factores, tanto de incompatibilidad como factores externos, por ello es de gran importancia continuar con las actividades de mantenimiento posteriores al PI para garantizar la supervivencia a través del tiempo, así como tomar medidas preventivas tanto en los árboles donadores de púas como en los patrones antes de realizar los injertos, para evitar problemas de plagas o enfermedades posteriores.

2.5.3. Crecimiento en longitud del injerto

Los cuatro factores probados mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) en la variable de crecimiento en longitud del injerto (CLI) a los 60, 90 y 120 días de haberse realizado éste. También se presentó una interacción (genotipo-edad de patrón) con significancia en las tres fechas de evaluación (Cuadro 5). Para un análisis más apreciativo del crecimiento, se tomó en cuenta la última fecha de evaluación (120 días), ya que se consideró que mientras más tiempo tengan los injertos manifiestan más marcadamente su hábito y potencial de crecimiento. Esta variable de CLI es importante su análisis debido a que podría verse como un indicador del vigor del injerto (Greenwood et al., 2010), porque no solamente es importante obtener porcentajes altos de prendimiento, sino también se deben considerar los factores que pueden favorecer el crecimiento o vigor de los injertos para que puedan cumplir con los objetivos planteados. Jayawickrama et al. (1991) indican que el crecimiento está relacionado con el prendimiento del injerto, cuando crecen de forma normal y sana tienen una unión fuerte y por lo tanto es compatible. Por su parte Martínez-Ballesta et al. (2010) indican que una incorrecta formación de callo puede producir una reducción en el crecimiento de la púa.

2.5.3.1. Efecto del genotipo

El efecto del genotipo sobre el CLI tuvo diferencias significativas (Cuadro 5) y para la última evaluación a los 120 días, los injertos del genotipo (34) presentaron el mayor CLI con 15.6 cm, siendo superior a los otros tres genotipos probados (168, 51 y 101) por 3.9, 4.2 y 6.1 cm, respectivamente (Cuadro 6, Figura 13a). El genotipo (34) se mantuvo en las 3 evaluaciones con el mayor crecimiento (Cuadro 6). Esto indica que cada genotipo influyó de manera particular en el CLI, quizás debido al hábito de crecimiento del árbol donador y las diferencias se manifestaron por ser de diferentes procedencias. También se encontró algo similar en la investigación realizada por Pardos et al. (2003), evaluando el crecimiento de cinco genotipos de *Pinus halepensis*, encontrando que para el ciclo de invierno-primavera el crecimiento por genotipo tubo diferencias significativas en un rango de 19.1 a 28.3 cm y para el periodo de verano-otoño 16.8 a 26.1 cm. También Haines & Simpson (1994) encontraron diferencias estadísticamente significativas entre 8 diferentes genotipos donadores de púas sobre el CLI de *P. caribaea*.

Cabe señalar que los genotipos que presentaron mayor CLI de *P. leiophylla*, no coinciden con los mismos genotipos que presentaron mayor PI, esto nos indica que, por ejemplo, un genotipo con un porcentaje de prendimiento alto, no garantiza que presente el mejor crecimiento meses después del injertado.

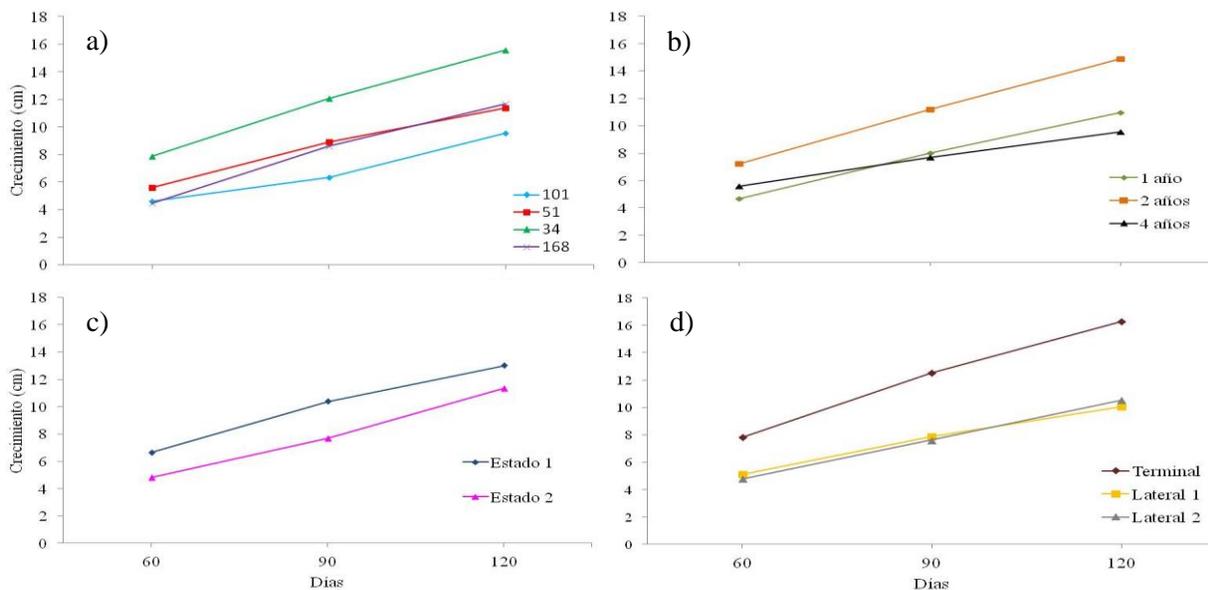


Figura 13. Crecimiento en longitud del injerto (cm) por factor. a) genotipo, b) edad del patrón, c) estado de desarrollo de la púa y d) tipo de injerto.

2.5.3.2. Efecto de la edad del patrón

El factor edad del patrón sobre el CLI presentó significancia estadística (Cuadro 5) y los valores promedio de evaluación a los 120 días muestran que los patrones de 2 años obtuvieron el valor más alto con 14.9 cm, y sobre los patrones de 1 y 4 años promovieron el CLI en 11.0 y 9.5 cm, respectivamente (Cuadro 6, Figura 13b). Los patrones de 2 años se mantuvieron con los valores más altos en las tres fechas de evaluación (Cuadro 6). Hibbert et al. (2011) sobre patrones de 7 años de *Abies fraseri* evaluaron el CLI a los 105 días, obteniendo en su mejor tratamiento 12.5 cm, este valor se encuentra dentro del rango obtenido para *P. leiophylla*, por su parte Greenwood et al. (2010) en patrones de 12, 53 y 127 años injertaron púas de *Picea rubens* de 12 años, encontrando diferencias significativas al año de injertado, con 37.0, 10.4 y 7.8 cm, respectivamente. Los mismos autores también injertaron púas de árboles de 53 años, obteniendo la misma tendencia en el CLI con 27.8, 13.4 y 8.0 cm en patrones de 12, 53 y 127 años, respectivamente. Estos resultados muestran la tendencia que a mayor edad del patrón promueve menor crecimiento del injerto, posiblemente porque la púa se ve influenciada por el hábito y potencial de crecimiento del patrón y que va disminuyendo conforme aumenta su edad. Hay evidencia que los patrones pueden alterar la tasa de crecimiento de las púas injertadas en coníferas, algunos patrones causan rápido crecimiento, mientras que en otros se reduce el crecimiento y algunos intermedios (Jayawickrama et al., 1991).

Esta tendencia se manifestó en los patrones de 2 y 4 años de *P. leiophylla*, en patrones de dos años se observó mayor potencial de crecimiento sobre la púa injertada en comparación con los patrones de 4 años, quizás por la estructura de copa en los patrones de 4 años presentaba mayor ramificación y generalmente no presentaba una yema con una clara dominancia apical. Al comparar el CLI en los patrones de 2 años con los de 1 año, los más jóvenes no mostraron mayor crecimiento posiblemente porque presentaban un sistema radicular menos desarrollado, que los de dos años, por lo tanto, tenían menor capacidad en el consumo y suministro de agua y nutrientes a la púa, lo cual influyó en su crecimiento (Martínez-Ballesta et al., 2010). Bletsos (2005) indica que el desarrollo de un sistema adecuado de raíces ha sido relacionado con el mejoramiento de crecimiento de plantas injertadas. Aunque también se ha demostrado que la influencia del patrón sobre la diferencia en el crecimiento de la púa se debe a factores hormonales como en el caso de la auxina que es transportada a diferentes tasas y los efectos de la producción de citocinina en las raíces depende de cada patrón (Darikova et al., 2013), así como

una hipótesis probada de un individuo o un grupo utilizado como patrón que crece lentamente, la púa injertada podría crecer también lentamente (Jayawickrama et al., 1991).

2.5.3.3. Efecto del estado de desarrollo inicial de la púa

Se manifestaron diferencias significativas en las tres evaluaciones a los 60, 90 y 120 días de injertadas las púas (Cuadro 5), alcanzando un crecimiento de 13.0 y 11.3 cm para los estados de desarrollo de las púa 1 y 2, respectivamente (Cuadro 6, Figura 13c). Las características de las púas en el “estado 1” favorecen la aplicación de la técnica de injertado y es más práctico su manejo en comparación con las del “estado 2”.

Al utilizar púas en estos primeros estados de desarrollo, ya sean el 1 o 2, cuando termina la dormancia, quizás se vea menos afectado el crecimiento de la púa injertada, ya que apenas iniciará su fase activa de crecimiento (Viveros & Vargas, 2007), en comparación al utilizar púas en estados de desarrollo más avanzados, donde se interrumpiría su crecimiento en el periodo de prendimiento (primeros 60 días) mientras se establecen las conexiones en el punto de unión. Pero, para tener una idea más clara acerca de este factor, será necesario hacer una investigación específica, para determinar qué estado de desarrollo de la púa a lo largo del año favorece más el CLI en *P. leiophylla*.

2.5.3.4. Efecto del tipo de injerto

El tipo de injerto terminal mostró diferencia significativa (Cuadro 5) y mayor CLI en la evaluación a los 120 días con 16.3 cm en comparación con los otros dos tipos de injerto probados (Lateral 1 y 2) con 10.1 y 10.6 cm, respectivamente; para las tres evaluaciones el tipo de injerto terminal fue superior a las otras dos técnicas probadas (Cuadro 6, Figura 13d). Por su parte Becerra & Plancarte (1993) no encontraron diferencias significativas entre injertos terminales y laterales en *P. greggii* sobre el CLI a los 210 días, obteniendo un promedio de 18.9 cm, superior a lo obtenido para *P. leiophylla*.

Posiblemente esta diferencia entre tipos de injerto se deba, a que en los terminales se sustituye la yema con dominancia apical y esta posición de la púa injertada se ve más favorecida en el flujo de agua y nutrientes que requiere para su crecimiento (Pallardy, 2008), en comparación con la posición de la púa en los injertos laterales. También se debe considerar que a partir de los 75 días de realizar los injertos laterales se les aplicó una poda de toda la copa del patrón (en 3 etapas) y al final de ésta poda, solamente quedaron las nuevas acículas que desarrolló el injerto, con las cuales debe realizar todas las actividades de fotosíntesis y transpiración, estos factores pueden repercutir y hacer diferencia en el crecimiento de los injertos laterales con los terminales. Si se considera el crecimiento del injerto como un indicador de su vigor, se pudiera recomendar aplicar la técnica de injertos terminales en posteriores trabajos de injertos en *P. leiophylla*, sin embargo, se deben considerar las ventajas y desventajas de cada técnica.

2.5.3.5. Efecto de la interacción entre factores

La interacción que mostró significancia en las tres fechas de evaluación fue el genotipo-edad del patrón (Cuadro 5). En la evaluación a los 120 días, las púas de los 4 genotipos mostraron afinidades particulares en el CLI sobre determinadas edades de patrón, los mayores CLI fueron los genotipos 34 y 168 injertados sobre patrones de 1 año, los genotipos 34 y 51 en patrones de 2 años y los genotipos 34 y 101 en patrones de 4 años. El genotipo que mayor CLI presentó fue el 34 independientemente de la edad de patrón utilizada (fue más estable), lo que pudiera indicar que las púas de este genotipo estuvieron menos influenciadas por el hábito de crecimiento de los patrones que va reduciendo su crecimiento al aumentar su edad (Greenwood et al., 2010).

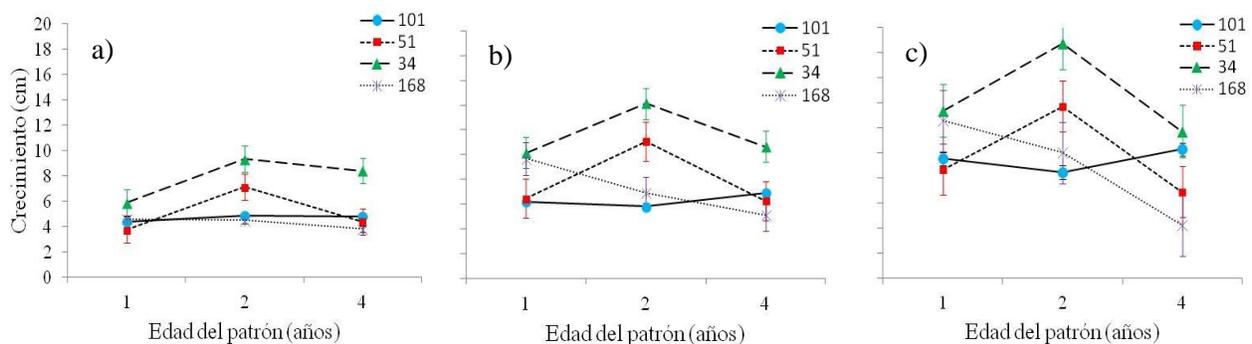


Figura 14. Interacciones con significancia ($p \leq 0.05$) para el crecimiento en longitud del injerto (cm) en *P. leiophylla*. a) 60 días, b) 90 días, c) 120 días; cada punto representa el promedio con el error estándar.

2.6. CONCLUSIONES

Se logró la clonación por medio de injerto de árboles de más de 28 años de edad de *Pinus leiophylla*. Los genotipos probados mostraron diferencias en el efecto de la variable de porcentaje de PI, el genotipo 51 obtuvo el valor más alto. Se presentó un mayor PI sobre patrones de 1 y 2 años y el valor menor en patrones de 4 años. El estado de desarrollo de la pua denominado “estado 1” favoreció más el PI. Los dos tipos de injertos laterales (L1 y L2) favorecieron el PI sobre el injerto terminal.

La variable de CLI de *P. leiophylla* mostró diferencias significativas en los cuatro factores probados; el genotipo 34 presentó el mayor CLI; los patrones de 2 y 1 año manifestaron mayor potencial de crecimiento en la longitud de la púa injertada; la púa en el “estado 1” de desarrollo obtuvo un mayor valor en el CLI durante las fechas de evaluación. Los injertos terminales favorecieron más el CLI en comparación con los injertos laterales.

La supervivencia de los injertos prendidos fue disminuyendo por diversos factores conforme pasó el tiempo, por lo que se deben realizar actividades preventivas para evitar pérdidas posteriores.

2.7. LITERATURA CITADA

- Barbosa, G. M. G., (1984). Pruebas de injertado en *Pinus pseudostrobus* var. Oaxacana Mtz. en los altos de Chiapas. Boletín técnico No. 99, SARCH, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales [INIF]. 35p.
- Becerra, E. C., & Plancarte, B. A. (1993). Propagación asexual en *Pinus greggii* mediante injertos, enraizado de estacas y acodos aéreos. *Agrociencia*, 3(1), 97-110.
- Blada, I., & Panea, T. (2011). Improvement of grafting procedures for the ornamental species: I. *Picea pungens* Engelm. var. *glauca* Regel. *Annals of Forest Research*, 54(2), 139.
- Blada, I., & Panea, T. (2012). Improvement of grafting procedures for the ornamental species: II. *Abies concolor* [(Gord. & Glend.) Lindl]. *Annals of Forest Research*, 55(1), 3.
- Bletsos, F. A. (2005). Use of grafting and calcium cyanamide as alternatives to methyl bromide soil fumigation and their effects on growth, yield, quality and fusarium wilt control in melon. *Journal of Phytopathology*, 153(3), 155-161.
- Bonga, J. M. (2016). Conifer clonal propagation in tree improvement programs. In Park Y., Bonga J., & Moon, H., *Vegetative propagation of forest trees*. (pp. 3-31). Seoul, Korea: National Institute of Forest Science.
- Carrera, G. M. V. S. (1977). La propagación vegetativa en el género *Pinus*. *Ciencia forestal*, 2(7), 3-29.
- Carrera, G. M. S. & Villaseñor, R. R. (1982). Ensayo de dos métodos de injerto en *Pinus pseudostrobus* Lindl. Boletín técnico no. 75. SARH. SFF. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales [INIF]. México, D. F.: INIF. 15 p.
- Castaño, J. R., Oliet, M. E., Abellanas, B., Butler, I., Cosano, I., Luengo, J., ... & Candela, J. A. (2004). Puesta en valor de los recursos forestales mediterráneos: el injerto de pino piñonero (*Pinus pinea* L.). *Manuales de restauración forestal*, 9, 94-145.
- Castelán, M. N. (2014). *Fisiología de plántulas de Pinus leiophylla sometidas a estrés hídrico*. Tesis de maestría. Colegio e Postgraduados. Texcoco, Edo. de México, México. 80 p.
- Cibrián, T. C., Alvarado, R. D., & García, D. S. E. (2007). *Enfermedades forestales en México*. Edo. de México, México: Universidad Autónoma Chapingo. pp. 502-503.
- Copes, D. L. (1969). Graft union formation in Douglas-fir. *American Journal of Botany*, 56(3), 285-289.
- Copes, D. L. (1980). Development of internal graft incompatibility symptoms in *Pinus radiata* D. Don. *New Zealand Journal Forestry Science*, 10(2), 367-380.
- Cuevas, C. J. C. (2014). *Propagación vegetativa de Pinus leiophylla SCHIEDE EX SCHLTDL. ET CHAM*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Texcoco, Edo. de México, México. 72 p.
- Cuevas, C. J. C., Jiménez, C. M., Jasso, M. J., Pérez, R. P., López, U. J., & Villegas, M. Á. (2015). Propagación asexual de *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. et Cham. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 21(1), 81-95.
- Darikova, J. A., Savva, Y. V., Vaganov, E. A., Grachev, A. M., & Kuznetsova, G. V. (2011). Grafts of woody plants and the problem of incompatibility between scion and rootstock (a review). *J Siberian Federal Univ (Biology)*, 1(4), 54-63.
- Darikova, Y. A., Vaganov, E. A., Kuznetsova, G. V., & Grachev, A. M. (2013). Changes in the anatomical structure of tree rings of the rootstock and scion in the heterografts of Siberian pine. *Trees*, 27(6), 1621-1631.

- Dhawan, V., & Saxena, S. (2004). Cloning Forestry Species. In Sirivastava, P. S., Narula, A., & Sirivastava, S., *Plant Biotechnology and Molecular Markers* (pp. 183-194). New Delhi, India: Springer Netherlands.
- Dvorak, W. S., Hodge, G. R., & Kietzka, J. E. (2007). Genetic variation in survival, growth, and stem form of *Pinus leiophylla* in Brazil and South Africa and provenance resistance to pitch canker. *Southern Hemisphere Forestry Journal*, 69(3), 125-135.
- Eguiluz, P. T. (1978). Ensayo de integración de los conocimientos sobre el género *Pinus* en México. Tesis de. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. de México, México. pp. 134-149.
- Gil, S. L., & Pérez B. V. (1986). *El injerto en los pinos*. España: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 24 p.
- Goldschmidt, E. E. (2014). Plant grafting: new mechanisms, evolutionary implications. *Frontiers in plant science*, 5, 1-9.
- Gómez, J., D. M., Ramírez, H. C., Jasso, M., J., & López, U., J. (2010). Variación en características reproductivas y germinación de semillas de *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. *Revista fitotecnica mexicana*, 33(4), 297-304.
- Greenwood, M. S., Day, M. E., & Schatz, J. (2010). Separating the effects of tree size and meristem maturation on shoot development of grafted scions of red spruce (*Picea rubens* Sarg.). *Tree physiology*, 30(4), 459-468.
- Haines, R. J., & Simpson, J. A. (1994). Scion-rootstock relationships with respect to height growth and foliar concentrations of nitrogen and phosphorus in reciprocal grafts of *Pinus caribaea* var. hondurensis. *New forests*, 8(1), 71-79.
- Hallett, R. D., Smith, R. F., & Burns, T. W. (1981). *Manual for greenhouse grafting of conifers in the Maritimes*. Canadian Forestry Service Environment Canada.
- Hartmann, T. H., Kester, E. D., Davies, Jr. T. F. & Geneve, L. R. (2011). *Plant propagation principles and practices* (18 va ed.). New Jersey, EUA: Prentice Hall. 915 p.
- Hernández, M. G. (2016). *Colonización micorrízica en plantas de Pinus leiophylla Schiede ex Schltdl. & Cham. en condiciones de anegamiento*. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Edo. de México, México. 62 p.
- Hibbert-Frey, H., Frampton, J., Blazich, F. A., & Hinesley, L. E. (2010). Grafting Fraser fir (*Abies fraseri*): Effect of grafting date, shade, and irrigation. *HortScience*, 45(4), 617-620.
- Hibbert-Frey, H., Frampton, J., Blazich, F. A., Hundley, D., & Hinesley, L. E. (2011). Grafting Fraser Fir (*Abies fraseri*): effect of scion origin (crown position and branch order). *HortScience*, 46(1), 91-94.
- Hinesley, E., & Frampton, J. (2002). Grafting Fraser fir onto rootstocks of selected *Abies* species. *HortScience*, 37(5), 815-818.
- Jasso, M. J., & Jiménez, C. M. (1994). Fenología vegetativa y reproductiva de *Pinus leiophylla* en un huerto semillero sexual. XV Congreso de Fitogenética. pp. 149.
- Jayawickrama, K. J. S., Jett, J. B., & McKeand, S. E. (1991). Rootstock effects in grafted conifers: A review. *New Forests*, 5(2), 157-173.
- Jiménez, C. M. & Jasso, M. J. (2011). Infección por escamas en árboles de un huerto semillero sexual de *Pinus leiophylla* Schl. et Cham. XVI Simposio Nacional de Parasitología Forestal. Cuernavaca Morelos. pp. 226.
- Jiménez, C. M., & Zwiazek, J. J. (2014). Adventitious sprouting of *Pinus leiophylla* in response to salt stress. *Annals of Forest Science*, 71(7), 811-819.

- Kollmann, R., & Glockmann, C. (1985). Studies on graft unions. I. Plasmodesmata between cells of plants belonging to different unrelated taxa. *Protoplasma*, 124(3), 224-235.
- Macdonald, B. (2002). *Practical woody plant propagation for nursery growers*. Oregon, EUA: Timber Press. pp. 443-456.
- Martínez-Ballesta, M. C., Alcaraz-López, C., Muries, B., Mota-Cadenas, C., & Carvajal, M. (2010). Physiological aspects of rootstock–scion interactions. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 112-118.
- Martínez, T. T., Vargas, H. J. J., López, U. J., & Muñoz, O. A. (2002). Respuesta al déficit hídrico en *Pinus leiophylla*: Acumulación de biomasa, desarrollo de hojas secundarias y mortandad de plántulas. *Terra*, 20, 291-301.
- Medina, P. A. M., White, T. L., Huber, D. A., & Martin, T. A. (2007). Graft survival and promotion of female and male strobili by topgrafting in a third-cycle slash pine (*Pinus elliottii* var. *elliottii*) breeding program. *Canadian journal of forest research*, 37(7), 1244-1252.
- Mudge, K., Janick, J., Scofield, S., & Goldschmidt, E. E. (2009). A history of grafting. *Horticultural Reviews*, 35, 437-493.
- Muñoz, F. H. J., Prieto, R. J. A., Flores, G. A., Pineda, O. T., & Morales, G. E. (2013). Técnicas de injertado “enchapado lateral” y “fisura terminal” en *Pinus pseudostrobus* Lindl. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias [INIFAP]. Folleto técnico No. 6. 48p.
- Nienstaedt, H. (1965). Grafting northern conifers with special reference to white spruce. In *Proceedings, Region 9 State Nurserymen's Meeting, August* (pp. 24-26).
- Pallardy, S. G. (2008). *Physiology of woody plants* (3a ed.). San Diego, EUA: El Sevier Inc.
- Pardos, M., Climent, J., Gil, L., & Pardos, J. A. (2003). Shoot growth components and flowering phenology in grafted *Pinus halepensis* Mill. *Trees*, 17(5), 442-450.
- Perry, Jr. P. J. (1991). *The Pines of Mexico and Central America*. Oregon, EUA: Timber Press. 231p.
- Pina, A., & Errea, P. (2005). A review of new advances in mechanism of graft compatibility–incompatibility. *Scientia Horticulturae*, 106(1), 1-11.
- Pina, A., Errea, P., Schulz, A., & Martens, H. J. (2009). Cell-to-cell transport through plasmodesmata in tree callus cultures. *Tree physiology*, 29(6), 809-818.
- Ramírez, M., Krasowski, M. J., & Loo, J. A. (2007). Vegetative propagation of American beech resistant to beech bark disease. *HortScience*, 42(2), 320-324.
- Rodríguez-Banderas, A., Vargas-Mendoza, C. F., Buonamici, A., & Vendramin, G. G. (2009). Genetic diversity and phylogeographic analysis of *Pinus leiophylla*: a post-glacial range expansion. *Journal of biogeography*, 36(9), 1807-1820.
- Rodríguez, R. A., Hernández, J. J. V., Mendoza, J. V., & Upton, J. L. (2006). Efecto de la procedencia geográfica y de la fertilización en la fenología del brote terminal en plántulas de "Pseudotsuga sp". *Agrociencia*, 40(1), 125-137.
- Rodríguez-Franco, C. (2002). *Pinus leiophylla* Schtdl. & Cham. In: CAB international (ed) Pines of silvicultural importance (pp. 202-205). CABI publishing, Wallingford,
- Ruíz, M. P. (1985). *Propagación por dos técnicas de injertado en Pinus michoacana* Mtz. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. De México, México. pp. 22-40.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT]. (2013). La producción de resina de pino en México. Comisión Nacional Forestal [CONAFOR]. 93 p.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant physiology* (3a ed.). Massachusetts, EUA: Sinauer Associates, Inc.

- Vanderklein, D., Martinez-Vilalta, J., Lee, S., & Mencuccini, M. (2007). Plant size, not age, regulates growth and gas exchange in grafted Scots pine trees. *Tree physiology*, 27(1), 71-79.
- Vargas, H. J. J., & Vargas, A., J. I. (2016). Effect of giberellic acid (GA4/7) and girdling on induction of reproductive structures in *Pinus patula*. *Forest Systems*, 25(2), 1-11.
- Villaseñor, R. R., & Carrera, G. M. S. (1980). Tres ensayos de injerto en *Pinus patula* Schl. et Cham. *Ciencia Forestal*, 5(23), 21-36.
- Viveros, V. H., & Vargas, H. J. J. (2007). Dormancia en yemas de especies forestales. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 13(2), 131-135.
- White, T. L., Adams, W. T., & Neale, B. D. (2007). *Forest Genetics*. Massachusetts, EUA: CBAI. 682 p.
- Wright, W. J. (1976). *Introduction to Forest Genetics*. California, EUA: Academic Press. 463 p.
- Zobel, B., & Talbert, J. (1988). *Técnicas de Mejoramiento Genético de árboles forestales*. México D. F.: Limusa. 545p.

CAPITULO III. RESPUESTA DE *Pinus leiophylla* EN LAS FASES DE ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO*

3.1. RESUMEN

En la propagación *in vitro* es necesario primero superar exitosamente las primeras fases, donde el tipo de explante es un factor importante en el establecimiento y la aplicación de RCV en la fase de multiplicación. Explantes de árboles de más de 28 años de edad (maduros) de un huerto semillero sexual se obtuvieron para establecer y multiplicar el material vegetal bajo condiciones *in vitro*. En la fase de establecimiento se probaron dos tipos de explantes (yemas de ramas y brotes epicórmicos) en un medio MS, ambos de fuentes maduras. En la fase de multiplicación se probaron tres concentraciones de una mezcla de citocinina-auxina (BA-ANA) en proporción 10:1, así como explantes de brotes epicórmicos de árboles maduros, contrastando su respuesta con el mismo tipo de explantes, pero de fuentes juveniles (2 años). A los 30 días, se obtuvo el 43 % de establecimiento *in vitro* a partir de brotes epicórmicos. En la fase de multiplicación ambas fuentes de explantes (maduro y juvenil), indujeron el 20 % de brotes adventicios, sin embargo, la mejor respuesta en las variables de crecimiento en longitud del explante, número y longitud de brotes adventicios fue a partir de explantes de árboles juveniles con 1.4 cm, 4 y 4.4 mm, respectivamente. Los medios con RCV indujeron el desarrollo de brotes adventicios de 15-35 %, mientras que el medio sin RCV no indujo estas estructuras.

Palabras clave: Auxinas, brotes adventicios, brotes epicórmicos, citocininas, explantes.

RESPONSE OF *Pinus leiophylla* IN THE PHASES OF *IN VITRO* ESTABLISHMENT AND MULTIPLICATION

3.2. ABSTRACT

In the *in vitro* propagation is first necessary to successfully overcome the early phases, where explant type is an important factor in establishment and application of PGR in the multiplication phase. Explants of over 28 years old trees (matures) from a sexual seed orchard were obtained to establish and multiply plant material at *in vitro* conditions. In the establishment phase two explant types (branches bud and epicormic shoots) were tested in a MS medium, both from mature sources. In the multiplication phase, three concentrations of a cytokinin-auxin mixture in 10:1 ratio, as well epicormic shoot explants from mature trees contrasting their response with same explant type but juvenile sources (2 years old). At 30 days, the 43 % *in vitro* establishment from epicormic shoots was achieved. In the multiplication phase, both explant sources (juvenile and mature) induced 20 % adventitious shoots, however, the best response of explant length growth, adventitious shoot number and length variables was from explants of juvenile explants with 1.4 cm, 4 and 4.4 mm, respectively. Media with PGR induced 15-35 % development of adventitious shoots while the medium without PGR did not induce these structures.

Keywords: Auxins, adventitious shoots, epicormic shoots, cytokinins, explants.

3.3. INTRODUCCIÓN

En coníferas el cultivo de tejidos *in vitro* es una alternativa para la propagación de genotipos seleccionados que poseen alguna característica de alto valor económico o ecológico, al capturar de forma efectiva su ganancia genética (Cortizo et al., 2009; Rodríguez et al., 2007). Es el método de propagación relativamente más reciente (Niemi et al., 2007), en los últimos años una gran cantidad de especies de coníferas ha sido micropropagada, pero su grado de éxito depende de la especie, calidad del explante, medio de cultivo, reguladores de crecimiento, la edad del árbol donador y las interacciones entre todos ellos (Giri et al., 2004). En la mayoría de estas investigaciones que han tenido éxito se utilizaron explantes juveniles: embriones inmaduros, semillas, plántulas y cotiledones, principalmente (Parasharami et al., 2003). Sin embargo, muchas de las características de interés no pueden ser evaluadas hasta que los árboles llegan a la fase de madurez, que induce cambios en el comportamiento del meristemo, reduciendo el potencial de propagación del árbol (Bonga, 1981; Greenwood, 1995). Un árbol se considera maduro al llegar a su etapa de ontogenia denominada “fase de cambio” que es cuando pasa de un desarrollo vegetativo juvenil a uno reproductivo (Day & Greenwood, 2011).

Esto es un problema que impide la aplicación más amplia de la tecnología de cultivo de tejidos en especies leñosas en programas de mejoramiento genético, a pesar de los considerables esfuerzos en la investigación, la mayoría de las gimnospermas todavía son consideradas como extremadamente difícil de micropropagar en individuos de más de un año de edad, por ello es importante desarrollar métodos de micropropagación en coníferas maduras (Anderson & Ievinsh, 2002; Selby et al., 2005). El establecimiento y la inducción de brotes adventicios son las primeras etapas en la micropropagación, sin embargo, para árboles maduros de coníferas han sido pocos los trabajos que han tenido éxito: De-Diego et al. (2008) en *Pinus pinaster*, Cortizo et al. (2009) en *Pinus pinea*, Chang et al. (2001) en *Taxus mairei*, Parasharami et al. (2003) en *Pinus roxburghii* y Selby et al. (2005) en *Picea sitchensis*.

De acuerdo con Bonga (1981) la micropropagación en árboles maduros es posible solo cuando tienen rebrotes en el tocón u otras fuentes de tejido juvenil disponibles a lo largo de su vida. Esto se debe a que se presenta un gradiente de juvenil a maduro que va en sentido de la base del árbol a la copa (Wendling et al., 2014), por lo tanto, los brotes epicórmicos (BE) proporcionan material vegetal con características juveniles, para establecer un cultivo aséptico de árboles

adultos seleccionados (López et al., 2003). Existen algunas especies de pino que producen BE, como es el caso de *Pinus leiophylla* (Jiménez & Zwiazek, 2014; Perry, 1991).

P. leiophylla, es una especie con amplio rango de distribución en México (Perry 1991), se encuentra desde los 1600-3000 m de altitud. Su importancia se debe a que tiene gran habilidad para resistir incendios forestales de mediana intensidad, soporta condiciones adversas de suelo y de alta salinidad y tiene gran habilidad de colonización, por ello, es una especie a considerar en programas de reforestación de áreas degradadas (Jiménez & Zwiazek, 2014; Perry, 1991; Rodríguez-Banderas et al., 2009).

El objetivo de esta investigación es el establecimiento y multiplicación *in vitro* de explantes de árboles maduros de *P. leiophylla* de un huerto semillero sexual. En la etapa de establecimiento comparar dos tipos de explantes (BE contra yemas de ramas); en la fase de multiplicación, probar el efecto de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) en la inducción, número y longitud de brotes adventicios a partir de explantes de BE de árboles maduros contrastando su respuesta con explantes de árboles juveniles.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal utilizado en la etapa de establecimiento, se obtuvo de árboles de más de 28 años de edad (maduros) de un huerto semillero sexual de *Pinus leiophylla*, establecido en 1991 en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Estado de México en condiciones adversas de alta salinidad, con el objetivo de generar germoplasma tolerante a factores adversos por hibridación geográfica (Jasso et al., 1993). En la etapa de multiplicación se utilizaron explantes de esta misma fuente (maduros) y de árboles producidos en vivero de dos años de edad (juveniles), progenie de árboles del huerto.

3.4.1. Fase de establecimiento

En esta fase se probaron 2 tipos de explantes: yemas terminales y brotes epicórmicos (BE) de los árboles antes descritos, evaluando el porcentaje de establecimiento *in vitro* y contaminación. Los BE se colectaron de la corteza del tronco en los primeros 2 m a partir de la base. Este tipo de brotes emergen de yemas en latencia pegadas a la corteza, presentan solo hojas primarias, con una longitud promedio de 1.5 cm y diámetro de 1.3 mm, su tallo es suculento, sin aparente lignificación y con una yema primaria funcional (Figura 15e-g). Los explantes de yemas se colectaron de ramas del primer tercio de la copa en el mes de marzo al término de la dormancia e inicio de su crecimiento anual, tuvieron un primer alargamiento de 4 cm de longitud en promedio y 5 mm de diámetro, las escamas se encontraban cerradas y aún sin acículas, en esta condición permanecen algunos días antes de su elongación y desarrollo de acículas (Figura 15a y b).

Para la disección del explante con el árbol donador, en ambos casos se hizo un corte con bisturí no. 12 de forma transversal a su eje principal, en el caso de los brotes epicórmicos el corte se hizo desde la base, pegado a la corteza y en el caso de las yemas desde la base del nuevo crecimiento. Los explantes después de su colecta se colocaron en hielera para mantenerlos frescos y húmedos para el siguiente día ser cultivados *in vitro* en el laboratorio de biotecnología del CENID-COMEF del INIFAP, en la Ciudad de México.

En laboratorio, a los brotes epicórmicos primero se les recortaron las hojas primarias cerca del tallo principal (Figura 15h), en el caso de las yemas para tratar eliminar fuentes de contaminación se removió manualmente las escamas que aún se encontraban cerradas tratando

de no dañar su tejido (Figura 15c). A partir de este paso las condiciones asépticas fueron iguales para los dos tipos de explantes. A cada uno de ellos se les realizaron 4 lavados (tallados) con agua y jabón líquido comercial y enjuagados con agua corriente, se colocaron en una solución con fungicida captan® 3 g L⁻¹ por 90 min en agitación a 130 rpm, se enjuagaron 2 veces con agua destilada, posteriormente se trataron con etanol al 70 % durante 1.5 min, se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril, en seguida se pusieron en inmersión durante 10 min en cloro (hipoclorito de sodio de 4-6 %) al 30 %, adicionándole 200 µl L⁻¹ de Tween® 20 de SIGMA®. Finalmente, en campana de flujo laminar se enjuagaron 5 veces con agua destilada estéril.

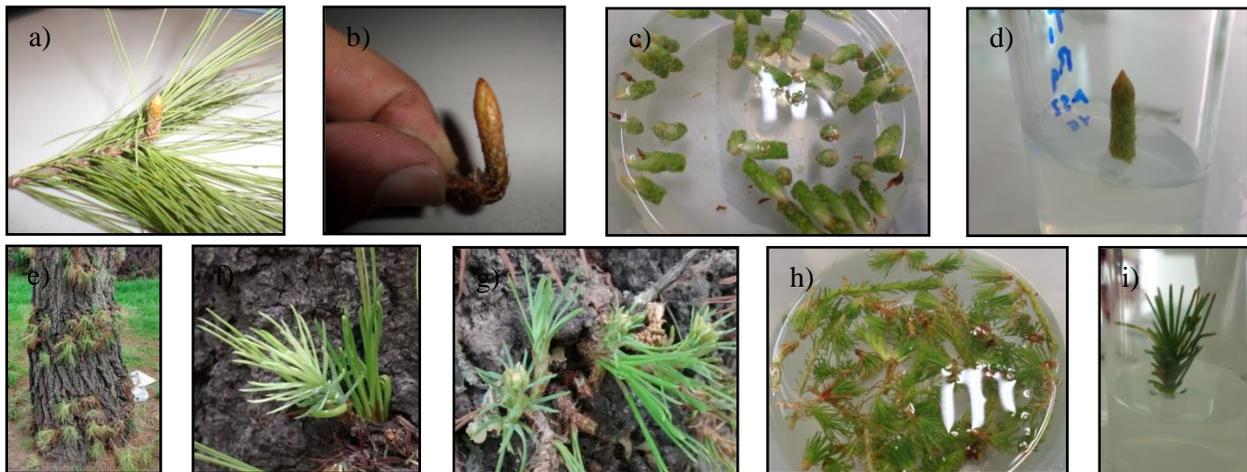


Figura 15. Explantes de árboles adultos de *P. leiophylla*. a) y b) explantes de yema, c) yemas sin escamas, d) yema cultivada *in vitro*, e) árbol donador, f) y g) brotes epicórmicos, h) preparación de explantes, i) brote epicórmico cultivado *in vitro*.

El medio de cultivo base utilizado para ambos tipos de explantes fue 4.43 g L⁻¹ Murashige y Skoog (1962) con vitaminas (MS), adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa (D-SUCROSE®) y 8 g de agar (Agar Plant®) todos de Phyto Technology Laboratories®, ajustando el pH a 5.7, mediante un dispensador se vaciaron 6 ml de medio a cada tubo de ensayo de 25 X 100 mm, el medio fue esterilizado en autoclave a 120 °C durante 15 min a una presión de 1.5 kg m² (Figura 16).

El establecimiento *in vitro* de explantes se realizó en campana de flujo laminar en condiciones asépticas, todo el material de laboratorio utilizado en esta etapa fue esterilizado previamente en autoclave, los cortes se hicieron con instrumentos de disección (bisturí no. 21 y pinzas) sobre cajas petri, haciendo un corte en la base del tallo del brote o de la yema ajustándolo a 1.5 cm de longitud. Se cultivó un explante con su yema apical por cada tubo de ensayo, se sellaron con vitafilm y etiquetaron para llevar un buen control del experimento (Figura 16).

Posterior a ser colocados en medio de cultivo, se pasaron a un cuarto de incubación de ambiente controlado a una temperatura de 24 ± 2 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz producidas por lámparas de alógeno con una intensidad lumínica de $56.1 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ y 8 horas de oscuridad (Figura 16g). Durante un mes se realizaron evaluaciones una vez por semana para determinar el porcentaje establecimiento *in vitro* (vivos y muertos), así como contaminación (hongo o bacteria) y oxidación para ambos tipos de explantes.

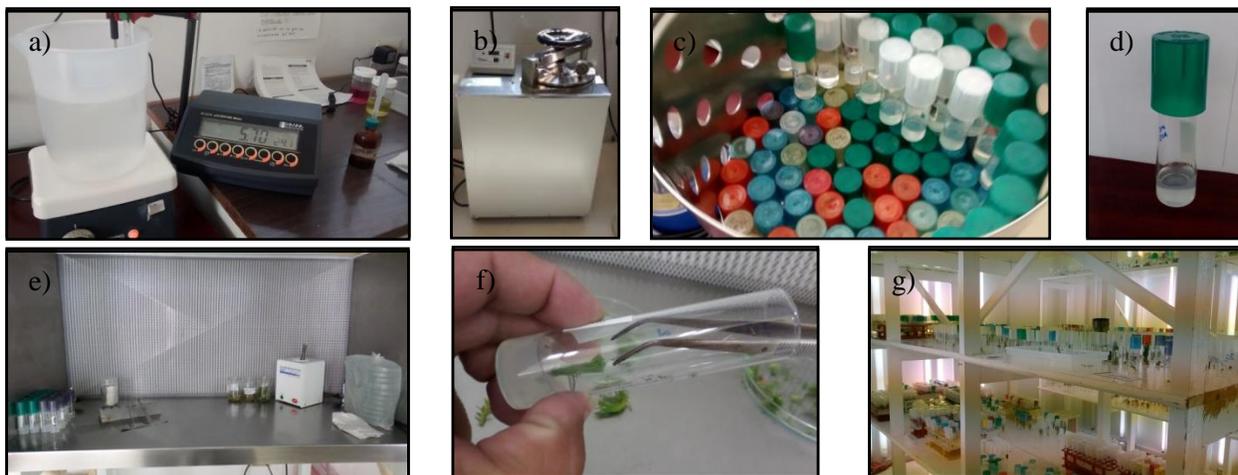


Figura 16. Actividades para el establecimiento *in vitro* de *P. leiophylla*. a-d) medio de cultivo MS, e) campana de flujo laminar, f) cultivo *in vitro*, g) cuarto de incubación.

3.4.2. Fase de multiplicación

En esta fase se utilizó un solo tipo de explante, BE de los árboles de *P. leiophylla* de la misma fuente utilizada en la fase anterior (árboles maduros de más de 28 años) y de árboles de 2 años (juveniles) producidos en vivero. Se aplicó el mismo protocolo de colecta y condiciones asépticas para brotes epicórmicos descritas en la fase anterior. Se probaron 4 tratamientos: tres medios de cultivo con diferentes concentraciones de una mezcla de citocinina (BA) y auxina (ANA) en una proporción 10:1, respectivamente y un testigo sin RCV.

El tratamiento 1 (testigo) correspondió a un medio de cultivo base (MS); el tratamiento 2 (concentración baja) en un medio basal MS adicionado con $4.44 \mu\text{M}$ de Benciladenina (BA) y $0.54 \mu\text{M}$ de Ácido naftanelacético (ANA); tratamiento 3 (concentración media) en medio basal MS con $8.88 \mu\text{M}$ de BA y $1.07 \mu\text{M}$ de ANA; tratamiento 4 (concentración alta) en medio de cultivo MS con $17.76 \mu\text{M}$ de BA y $2.15 \mu\text{M}$ de ANA. A todos los medios se les adicionaron 30 g

L⁻¹ de sacarosa y 8 g de agar, el pH se ajustó a 5.7, a cada tubo de ensayo de 25 X 100 mm se le vaciaron con un dispensador 6 ml de medio, posteriormente se esterilizaron en autoclave.

En condiciones asépticas en campana de flujo laminar se realizó el cultivo de los explantes, sobre cajas petri, haciendo un corte en la parte basal de los explantes, para eliminar el tejido dañado o muerto ya que la base es la que está en contacto con el medio. Se cultivó un explante con su yema apical por tubo de ensayo, se sellaron y etiquetaron. Finalmente se pasaron a un cuarto de incubación con las mismas condiciones que en la fase anterior. Durante un mes se realizaron evaluaciones una vez por semana para determinar el porcentaje de contaminación y oxidación, explantes vivos y su crecimiento en longitud, así como porcentaje de inducción, número y longitud de brotes adventicios por explante.

3.4.3. Diseño experimental

En las dos fases se utilizó un diseño experimental completamente al azar. En la primera fase se utilizaron 120 repeticiones para cada tipo de explante y solo se evaluó el porcentaje de establecimiento. En la fase de multiplicación fue 2 x 4 (dos edades del árbol donador de explantes y 4 medios) con 10 repeticiones por tratamiento, se realizó un análisis de varianza y se hizo una comparación múltiple de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), en el programa estadístico (Statistical Analysis System 9.00 [SAS, 2002]). Los datos obtenidos al no cumplir con los supuestos de normalidad, antes de realizar el análisis de varianza la variable de porcentaje (Y) se transformó con la función arcoseno de la raíz cuadrada del valor original expresado en fracción decimal [$T = \arcseno(\sqrt{Y})$]. La variable número de brotes se transformó con la función logaritmo [$T = \log_{10}(Y)$]. Seguido de esto los valores promedio de la variable porcentaje se transformaron nuevamente a las unidades originales con la función [$Y = 100 \text{ seno}^2(T)$] y para la variable conteo con la función [$Y = 10^T$] (Sampayo et al., 2016).

3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1. Fase de establecimiento

A los 30 días del establecimiento de los explantes de *P. leiophylla*, se encontró que las yemas colectadas de ramas presentaron una mortalidad total, por ello, no se realizaron análisis estadísticos para determinar si hubo diferencias significativas, ya que los explantes de BE presentaron a la misma fecha de evaluación un 43 % de establecimiento efectivo (Cuadro 7).

Cuadro 7. Respuesta de establecimiento *in vitro* de dos tipos de explantes de árboles maduros de *P. leiophylla* a los 30 días de su cultivo.

Tipo de explante	Explantes no establecidos (%)				Explantes establecidos (%)
	Hongo	Bacteria	Oxidación	Total	
Yema terminal de ramas	8	29	63	100	0
Brote epicórmico	49	5	3	57	43

Un factor para obtener éxito en la etapa de establecimiento *in vitro* es la elección correcta del explante dependiendo del objetivo del estudio (Bhojwani & Dantu, 2013). La mayoría de las investigaciones de micropropagación en coníferas, se ha utilizado como explantes, fuentes juveniles (embriones cigóticos, semillas, partes de plántulas, cotiledones, etc.), pero existen a la fecha pocos estudios referentes al uso de yemas o BE y sobretodo de árboles maduros, ya que su envejecimiento causa pobre o nula respuestas *in vitro* (De-Feria et al., 2009; Singh et al., 2015), pero hasta esta fase de su ciclo de vida es cuando ha sido probado su potencial genético y seleccionados por alguna característica de interés (Bonga et al., 2010).

3.5.1.1. Establecimiento de yemas

En la etapa de establecimiento en *P. leiophylla*, el 63 % de pérdida de los explantes de yemas fue por oxidación de tejidos (Cuadro 7), ocasionado por la liberación de exudados, en los primeros 5 días de su cultivo la mayoría de los explantes de la parte donde se les realizó el corte, las yemas comenzaron a perder su color verde hasta oscurecerse totalmente, en el medio de cultivo se formó un “halo” en la base del explante (Figura 17a, b y c). De acuerdo con un estudio hecho por

Tang & Newton (2004) en *Pinus virginiana* indican que dichos exudados pueden llegar a ser fitotóxicos para el explante y la naturaleza de estos aún no es precisa, aunque se conoce que es una mezcla compleja de sustancias fenólicas (metabolitos secundarios). El grado de oxidación depende del contenido de fenoles en el explante presentándose mayormente en leñosas maduras (Bhojwani & Dantu, 2013; Malabadi & Van-Staden, 2005; Pirttilä et al., 2008).

De acuerdo con Bonga (2016) son pocos los estudios a nivel mundial reportados con éxito en el establecimiento *in vitro* de árboles adultos de coníferas utilizando como fuente de explante yemas apicales o axilares: De-Diego et al. (2008) en *Pinus pinaster* con árboles 20 años de edad, Cortizo et al. (2009) en *Pinus pinea* de 20-25 años, Chang et al. (2001) en árboles de *Taxus mairei*, Parasharami et al. (2003) en *Pinus roxburghii* de 30 años con un establecimiento de 73 %, Nadgauda et al. (1993) *Pinus caribaea* y *Pinus kesiya* de 20 años con un establecimiento de 73 y 83 %, respectivamente y Selby et al. (2005) en *Picea sitchensis* de 2-33 años.

En el presente estudio la contaminación (hongo o bacteria) que se presentó fue causada por la presencia de microorganismos adheridos o endógenos presentes en el explante, ya que las yemas presentaban resina en su superficie y se favoreció la adhesión de agentes contaminantes por que los árboles donadores crecen directamente en campo y están expuestos a plagas, enfermedades y polvo (Hernández & González, 2010). La contaminación probablemente causada por bacterias de tipo endógeno en yemas fue de 29 %, estos explantes también presentaban oxidación y liberación de exudados, observándose que de ellos se iniciaba la contaminación (Figura 17d y e), Hernández & González (2010) indican que ese tipo de microorganismos pueden colonizar el interior del explante, por lo que es difícil de detectarlos y eliminarlos, debido a que escapan de la esterilización superficial; hay evidencia que en el interior de algunos explantes utilizados *in vitro* son colonizadas por bacterias (Orlikowska et al., 2016), como lo reporta Pirttilä et al. (2008) en *Pinus silvestris*. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que las bacterias encontradas en las yemas de *P. leiophylla* establecidas *in vitro*, hayan estado adheridas en la superficie del explante. Solo el 8 % de los explantes establecidos *in vitro* de *P. leiophylla* presentaron contaminación por hongos (Cuadro 7), ya que una gran cantidad de ellos colonizan en las hojas, madera y corteza de los árboles donantes (Pirttilä et al., 2003).

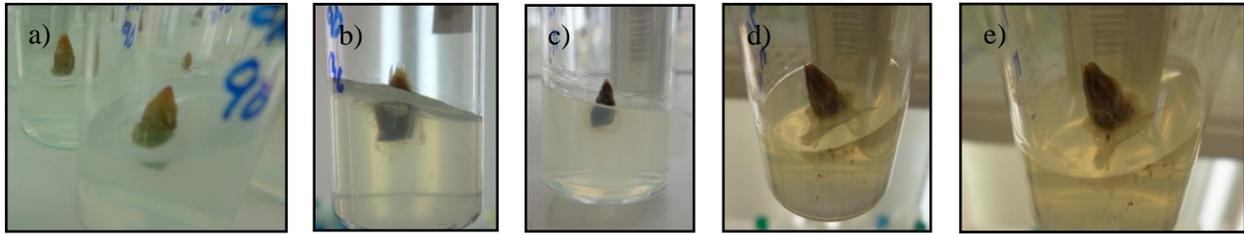


Figura 17. Establecimiento *in vitro* de yemas apicales de árboles adultos de *P. leiophylla*. a) primer día de cultivo, b) y c) oxidación de yemas, d) y e) contaminación por bacteria.

3.5.1.2. Establecimiento de brotes epicórmicos

Los explantes de BE presentaron 43 % de establecimiento *in vitro* a los 30 días de su cultivo, las causas de los no establecidos fueron por contaminación (hongo o bacteria) u oxidación en 49, 5 y 3 %, respectivamente (Cuadro 7). Los explantes a los 7 días presentaban las mismas condiciones que al momento de su cultivo, a los 15 días algunos explantes comenzaron a emitir fascículos, a los 23 días iniciaron la brotación de acículas (Figura 18), a los 30 días algunos explantes ya habían desarrollado acículas nuevas e incrementado en longitud, como se muestra en la Figura 18f (el color amarillo representa el tamaño inicial y el rojo el crecimiento en 30 días).

Estos resultados en *P. leiophylla* se podrían considerar relevantes, ya que de acuerdo con Bonga (2016) y Bonga & Von-Aderkas (1993) a pesar de los esfuerzos en la investigación a nivel mundial, muchas especies de gimnospermas son consideradas extremadamente difíciles de micropropagar al llegar a su “fase de cambio”, cuando pasa de un desarrollo vegetativo juvenil a uno reproductivo (Day & Greenwood, 2011), en la cual las características morfológicas, fisiológicas, anatómicas y bioquímicas son distintas y afectan significativamente la propagación de las plantas (Baccarin et al., 2015).

El tipo de explante utilizado fue un factor de gran importancia, ya que de acuerdo con Bonga (2016) el cultivo *in vitro* en árboles maduros es posible cuando desarrollan tejidos que son más sujetos a la expresión de la totipotencia, como cuando presentan fuentes de tejido juvenil como rebrotes en el tocón, también llamados BE (Bonga, 1981; Hartmann et al., 2011), que son una ramificación de una yema suprimida que da origen a una rama con una medula no directamente conectada al eje de transporte (Morisset et al., 2012), estos proporcionan una fuente alternativa ideal de material vegetal con características juveniles, que favorecen el establecimiento y diferenciación *in vitro* a partir de un árbol maduro (Aftab, 2012; López et al., 2003).

En plantas leñosas exhiben un gradiente de juvenil a maduro (ontogenia) en el sentido de la base del tallo hacia la copa, conocido como el “cono de la juvenilidad”, observándose estas características más claramente en especies que son capaces de producir brotes en la base del tronco, por lo que esta región del árbol es considerada la más joven ontogénicamente y en contraste, la maduración es más alta cerca del meristemo apical en la región de la copa (Greenwood & Hutchinson, 1993; Wendling et al., 2014).

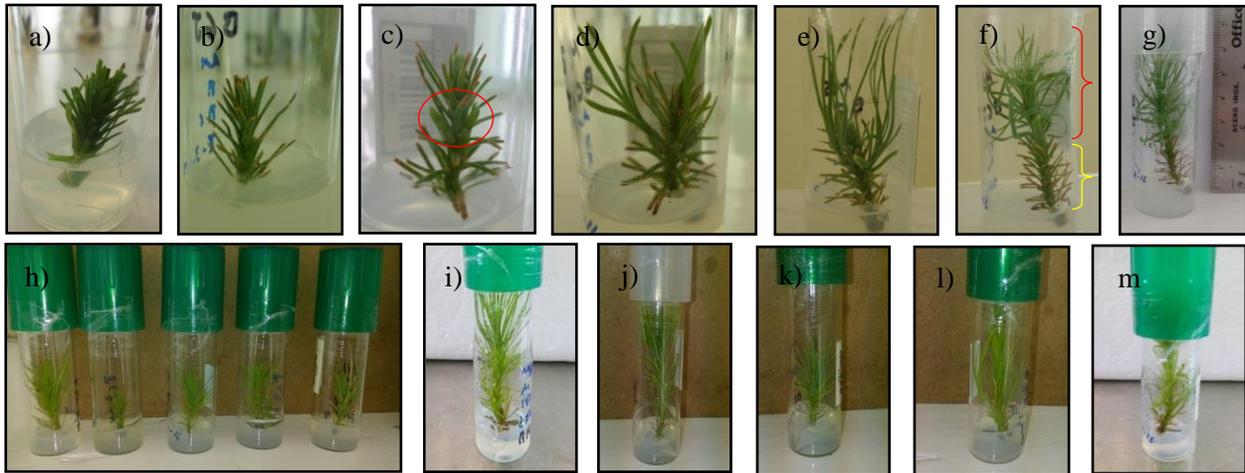


Figura 18. Establecimiento *in vitro* de BE de árboles adultos de *P. leiophylla*. a) primer día de cultivo, b) 7 días, c) 15 días, d) 23 días, e-m) 30 días.

Son pocas las especies en coníferas que presentan de forma natural BE (Bonga, 2010; Del-Tredici, 2001), como *P. leiophylla* (Jiménez & Zwiazek, 2014; Perry, 1991; Sánchez, 2016) y que por medio de este tipo de explantes permitió su establecimiento *in vitro* en la presente investigación. Algunas de las características juveniles que presentaban estas estructuras epicórmicas de *P. leiophylla* eran: tallo sin aparente lignificación, succulento y solo hojas primarias, que son similares a las emitidas en su fase de plántula, como lo reportan en algunas especies donde los brotes que crecen en la base de los árboles maduros de *Sequoia sempervirens*, *Olea europea* y *Araucaria cunninghamii* presentan las hojas con una morfología similar a las hojas de plántulas juveniles (Arnaud et al., 1993; García et al., 2000; Wendling et al., 2014).

Algunas otras especies de coníferas presentan BE: *Pinus canariensis*, *Pinus echinata*, *Pinus merkusii*, *Pinus rigida* (Climent et al., 2006), *Pinus radiata* (Hevia, 2013), *Pinus deltoides* (Del-Tredici, 2001) *Pseudotsuga menziesii* (Quine, 2004), sin embargo, solamente para árboles maduros de *Araucaria cunninghamii* (Burrows, 1990), *Sequoia sempervirens* (Arnaud et al.,

1993) y *Picea sitchensis* (Quine, 2004; Selby et al., 2005) se han establecido *in vitro* usando como fuentes de explantes BE; cabe señalar que en otras especies leñosas se ha utilizado más comúnmente este tipo de explantes de árboles maduros para el establecimiento *in vitro*, como en el género *Eucaliptus* (Baccarin et al., 2015; López et al., 2003) y más ampliamente en el género *Quercus* (Martínez et al., 2012; Valladares et al., 2006).

3.5.2. Fase de multiplicación

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas con ($p \leq 0.05$) en el factor “medio” en la variable de inducción de brotes y para el factor “explante” no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 8). Sin embargo, se debe considerar que el efecto de las citocininas en la fase de multiplicación del cultivo de tejidos *in vitro* varía de acuerdo con el medio de cultivo, el tipo y concentración de citocinina utilizada, la especie y edad de la planta donadora de los explantes (Van-Staden et al., 2008).

3.5.2.1. Factor explante

El explante como factor no mostró diferencias significativas para las variables evaluadas, esto indica que los BE de árboles de *P. leiophylla* maduros (28 años) presentan una respuesta positiva *in vitro* en la fase de multiplicación, ya que es similar a la respuesta obtenida en los explantes de árboles juveniles (2 años) de la misma especie, ya que los BE obtenidos de la base del tronco de árboles adultos presentaron características juveniles que manifestaron capacidad de diferenciación (Mikhalevskaya & Shabasheva, 2013; Wendling et al., 2014), lo que permitió la inducción de brotes adventicios *in vitro*, como ha sucedido en árboles adultos de *Sequoia sempervirens* (Arnaud et al., 1993), *Picea sitchensis* (Selby et al., 2005) y *Quercus robur* (Martínez et al., 2012) utilizando como fuente de explantes BE.

A pesar de no encontrar diferencias significativas a los 30 días del cultivo, la mejor respuesta *in vitro* en esta fase de acuerdo con los valores promedio, se observó en los explantes de BE de árboles juveniles de *P. leiophylla*, en comparación con los de árboles maduros. En la variable de crecimiento en longitud del explante, los colectados de árboles juveniles presentaron 1.4 cm, mayor que con los explantes de árboles maduros con solo 0.5 cm (Cuadro 8).

Cuadro 8. Valores de significancia de (p) del análisis de varianza de las variables de crecimiento del explante, inducción, número y longitud de brotes adventicios de *P. leiophylla* a los 30 días del establecimiento *in vitro*.

Factor	GL	CE (cm)	Brotes adventicios		
			Inducción (%)	Núm.	Long (mm)
Explante	1	0.115	0.868	0.132	0.227
Medio	3	0.220	0.009 [†]	0.547	0.086

[†]= Con diferencia significativa ($p \leq 0.05$). GL= grados de libertad; CE= crecimiento del explante; Núm.= número; Long= longitud.

Inducción de brotes adventicios (factor más importante en esta fase) se logró el 20 % para ambos tipos de explantes (juveniles y maduros) (Cuadro 9); un resultado similar se observó en *Taxus mairei*, en la inducción de brotes a partir de árboles maduros y juveniles, fue una diferencia mínima entre las dos edades probadas 52 y 49 %, respectivamente (Chang et al., 2001), sin embargo, Lapp et al. (1996) mencionan que la tasa de producción de brotes adventicios en su experimento con *Pinus monticola* fue declinando con la edad del árbol donador, obteniendo de 19 a 13 %, un resultado por debajo a lo obtenido para *P. leiophylla*. En general para esta investigación y otras similares donde se han utilizado como fuente de explantes individuos que van más allá de su etapa de plántula, han logrado un porcentaje de inducción de brotes *in vitro* relativamente bajo, en comparación con la mayoría de las investigaciones donde han utilizado como fuentes de explantes embriones cigóticos maduros o inmaduros, cotiledones o semillas, obteniendo alta respuesta en la inducción de brotes (Parasharami et al., 2003), como lo reporta Alonso et al. (2006) al obtener el 100 % de inducción de brotes en *Pinus pinea* a partir de cotiledones y Zhu et al. (2010) con plántulas de 4 semanas de germinación de *Pinus massoniana* un 93 %, no obstante, muchas de las características de interés no pueden ser evaluadas hasta que los árboles llegan a la fase de madurez (Bonga, 1981; Greenwood, 1995). Los brotes adventicios inducidos en *P. leiophylla* presentaron características externas similares en ambas fuentes (maduros y juveniles), con una yema apical para su crecimiento primario y el desarrollo de la parte aérea de una nueva planta, aunque los brotes adventicios de explantes juveniles mostraron más rápido desarrollo de hojas nuevas (Figura 19).

El número promedio de brotes adventicios obtenidos para *P. leiophylla* fue de 4 por explante en árboles juveniles y 2 en árboles maduros, concordando con lo obtenido por Selby et al. (2005), ya que se observó la misma tendencia, pero en explantes de yema de árboles de *Picea sitchensis*, de 2 años indujo 11 brotes por explante, mientras que en árboles de 33 años solamente 2. Los resultados obtenidos por diferentes autores al igual que en esta investigación en el número de brotes inducidos *in vitro* varía, pero dentro del rango de una baja tasa de multiplicación: Parasharami et al. (2003) en árboles de 30 años de *Pinus roxburghii* obtuvieron de 5-6 brotes adventicios por explante, Selby et al. (2005) en árboles de 20 años 5 brotes por explante y Lapp et al. (1996) solamente 1.5 brotes por explantes en *Pinus monticola* de 2 años de edad. Esta variable presenta un comportamiento similar a la anterior donde solamente al utilizar fuentes más juveniles se puede manifestar el máximo potencial de diferenciación, como lo reporta Alonso et al., 2006 al utilizar cotiledones obtuvieron 33 brotes por explante de *Pinus pinea*.

Al igual que para las variables anteriores, la mayor longitud de los brotes adventicios fue en explantes de árboles juveniles (4.4 mm) en comparación con los de árboles maduros (2.9 mm) (Cuadro 9).

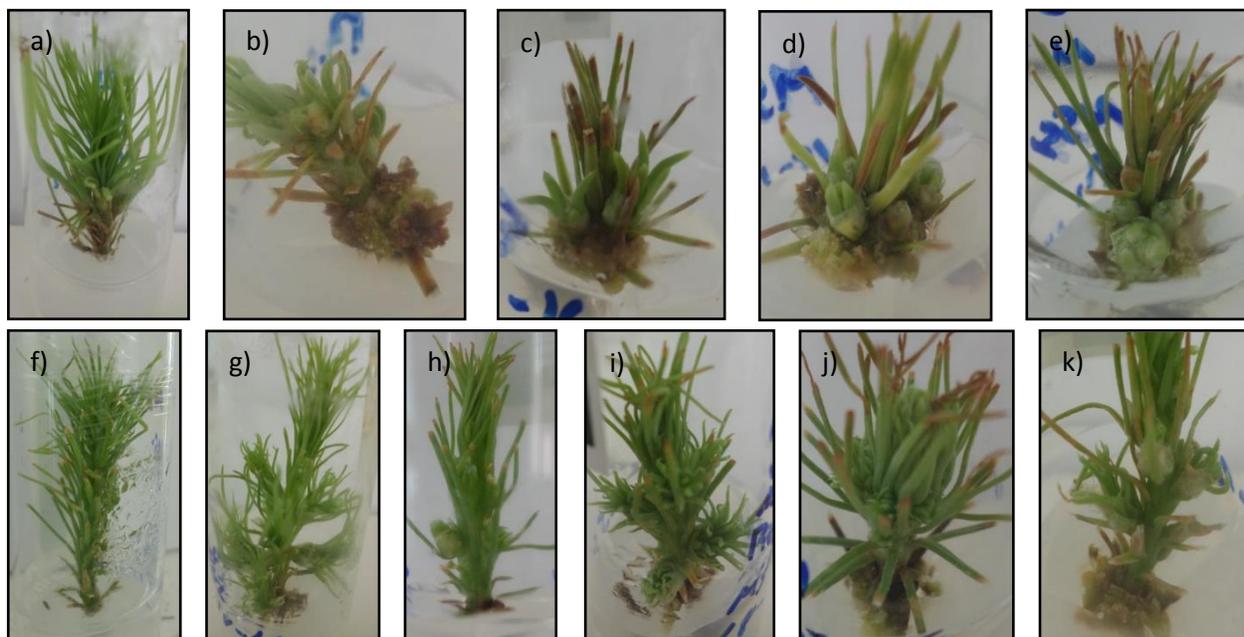


Figura 19. Inducción de brotes adventicios de explantes cultivados *in vitro* de *P. leiophylla*. Las imágenes superiores corresponden a explantes de árboles maduros y las inferiores a juveniles. a) MS1, b) MS2, c) MS3, d y e) MS4, f) MS1, g) MS2, h) MS3, i-k) MS4.

3.5.2.2. Factor medio de cultivo

La variable que presentó diferencias significativas ($p \leq 0.05$) fue la inducción de brotes adventicios, los medios de cultivo que contenían la mezcla de RCV (MS2, MS3 y MS4) promovieron la inducción de brotes, sin embargo, el medio de cultivo sin RCV no indujo brotes adventicios (MS1), así como se muestra la tendencia de que a mayor concentración de la mezcla de RCV utilizada, mayor porcentaje de inducción de brotes adventicios en los explantes de *P. leiophylla* establecidos *in vitro*, como se muestra en el Cuadro 9 para el MS1, MS2, MS3 y MS4 con 0, 15, 30 y 35 %, respectivamente. La BA es el RCV más usado en organogénesis, aunque la concentración juega un rol importante en la respuesta del explante; se han aplicado concentraciones altas de 25 μM de BA en árboles adultos en *Pinus brutia* y *Pinus radiata* para obtener respuesta organogénica (Zhang et al., 2003) y para *P. leiophylla* se aplicó como máximo 17.76 μM (MS4). Por su parte Cortizo et al. (2009) obtuvieron en árboles de *Pinus pinea* de 20 años una inducción de brotes en promedio para todo el experimento del 15 % y el mejor resultado de 27.7 % con la citocinina thidiazuron, mientras que con BA solo cerca del 10 %.

Cuadro 9. Valor promedio y error estándar para cada factor de los tratamientos probados en el crecimiento del explante, inducción, número y longitud de brotes y contaminación de *P. leiophylla* a los 30 días de su cultivo *in vitro*.

Factor	CE (cm)	Brotes adventicios			Contaminación (%)		
		Inducción (%)	Núm.	Long. (mm)	H	B	O
Explante							
BEAM	0.5±0.1a	20±2.3a	2±1.3a	2.9±0.5a	7.5±1.4	2.5±0.0	25±1.0
BEAJ	1.4±0.5a	20±1.9a	4±1.0a	4.4±0.4a	0.0±0.0	2.5±0.6	12.5±2.6
Medio							
MS1	1.9±1.1a	0±0.0b	-	-	5.0±2.6	0.0±0.0	15±0.5
MS2	0.7±0.4a	15±0.5a	5±1.1a	3.6±1.6a	0.0±0.0	0.0±0.0	20±0.3
MS3	0.6±0.3a	30±0.0a	4±1.8a	3.8±0.1a	0.0±0.0	10±2.6	10±5.3
MS4	0.5±0.2a	35±0.3a	4±1.4a	3.5±0.6a	10±5.3	0.0±0.0	5.0±2.6

Las letras minúsculas diferentes en columnas, indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). BEAM= brote epicórmico de árbol maduro; BEAJ= brote epicórmico de árbol juvenil; CE= crecimiento del explante; Núm.= número; Long.= longitud; H= hongo; B= bacteria; O= oxidación; MS1, MS2, MS3 y MS4= Murashige Skoog 1962 sin hormonas, concentración baja, media y alta, respectivamente.

Desde el punto de vista fisiológico la concentración más alta (MS4) probada para *P. leiophylla* aumentó la respuesta en el desarrollo de brotes adventicios, dirigiendo los nutrientes asimilados del medio de cultivo a ser empleados en la producción de brotes nuevos (De-Feria et al., 2009). Las citocininas son muy efectivas en la promoción directa o indirecta de iniciación de brotes, un balance entre citocininas y auxinas normalmente da una mayor respuesta organogénica (Van-Staden et al., 2008), así como se aplicó en los tratamientos evaluados, en una proporción de 10:1 de citocinina (BA) y auxina (ANA), también se debe considerar que los efectos varían de acuerdo a la concentración y tipo de citocinina, así como la respuesta de cada especie en particular (De-Feria et al., 2009). Las técnicas de inducción de brotes adventicios a partir de explantes en coníferas maduras son pocas y su conocimiento de respuesta *in vitro* aún es limitado (Cortizo et al., 2009).

El número y longitud de brotes adventicios no presentaron diferencias significativas en el medio de cultivo utilizado para *P. leiophylla*. Selby et al. (2005) obtuvieron 3 brotes en promedio con 10 μM de BA en arboles de *P. sitchensis* de entre 2-33 años, menor a lo obtenido para *P. leiophylla* con 4-5 brotes adventicios por explante para los tres medios con los RCV probados (MS2, MS3 y MS4) (Cuadro 9); sin embargo, De-Feria et al. (2009) obtuvieron 7 brotes adventicios por explante de *Pinus caribaea* en un medio con 6.6 μM de BA; también De-Diego et al. (2008) obtuvieron mejores resultados en esta variable con *Pinus pinaster* de más de 20 años al probar una concentración de 25 μM de BA, 22 brotes adventicios por explante, pero al probar 50 μM de BA solo indujo 17 brotes, lo que indica que existe un umbral límite superior en el que a cierta concentración de citocinina va reduciendo su potencial de organogénesis.

El crecimiento del explante no presentó diferencias significativas, pero se observa en los valores promedio, que el MS1 medio base sin RCV, promueve mayor crecimiento en longitud del explante con 1.9 cm y en los medios MS2, MS3 y MS4 con RCV presentaron menor crecimiento con 0.7, 0.6 y 0.5 cm, respectivamente, lo que indica que estos RCV probados inhiben en cierto grado el crecimiento en longitud del explante (Cuadro 9). Esta tendencia se observó en explantes de *Pinus caribaea* cultivados *in vitro*, al aumentar la concentración de BA fue disminuyendo la longitud del explante (De-Feria et al., 2009), ya que Van-Staden et al. (2008) mencionan que al utilizar altas concentraciones de citocininas, los brotes producidos, reducen el desarrollo en longitud del explante; debido a que los nutrientes asimilados del medio se emplean

principalmente en la producción de brotes nuevos De-Feria et al. (2009). Esta misma respuesta se observó en los explantes de *P. leiophylla* que solo presentaron un engrosamiento del tallo y formación de callo en la base que estaba en contacto con el medio, sin embargo, los explantes cultivados en el medio sin RCV (MS1) no mostraron estas características (Figura 19).

3.6. CONCLUSIONES

En un medio MS se logró el establecimiento *in vitro* de brotes epicórmicos de árboles maduros de más de 28 años de edad de *Pinus leiophylla*, sin embargo, al utilizar explantes de yemas de árboles maduros no se logró su establecimiento *in vitro*. En la fase de multiplicación a partir de explantes de brotes epicórmicos de árboles maduros presentaron una respuesta similar a los de una fuente juvenil (2 años) en las variables de longitud del explante, inducción, número y longitud de brotes adventicios; sin embargo, los explantes de árboles juveniles, mostraron los mayores valores promedio en su respuesta organogénica. La aplicación de RCV (citocinina-auxina) en el medio, indujo el desarrollo de brotes adventicios en comparación con los medios sin RCV. El avance obtenido en esta investigación permitirá continuar dicho procedimiento para después de multiplicar el mismo genotipo *in vitro* en forma masiva, establecer muestras para enraizamiento y posterior aclimatación.

3.7. LITERATURA CITADA

- Aftab, F. (2012). Progress and prospects for efficient micropropagation of woody plants. In Ashraf et al. (Eds.), *Crop Production for Agricultural Improvement* (pp. 363-377). Pakistan: Springer Netherlands.
- Alonso, P., Moncaleán, P., Fernández, B., Rodríguez, A., Centeno, M. L., & Ordás, R. J. (2006). An improved micropropagation protocol for stone pine (*Pinus pinea* L.). *Annals of forest science*, 63(8), 879-885.
- Andersone, U., & Ievinsh, G. (2002). Changes of morphogenic competence in mature *Pinus sylvestris* L. buds *in vitro*. *Annals of botany*, 90(2), 293-298.
- Arnaud, Y., Franclet, A., Tranvan, H., & Jacques, M. (1993). Micropropagation and rejuvenation of *Sequoia sempervirens* (Lamb) Endl: a review. *Annales des sciences forestieres* 50(3), 273-295.
- Baccarin, F. J. B., Brondani, G. E., de Almeida, L. V., Vieira, I. G., de Oliveira, L. S., & de Almeida, M. (2015). Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. *New Forests*, 46(4), 465-483.
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). Plant tissue culture: In Bhojwani & Dantu (Eds.) *introductory text* (pp. 245-274). India: Springer.
- Bonga, J. M. (1981). Organogenesis *in vitro* of tissues from mature conifers. *In vitro*, 17(6), 511-518.
- Bonga, J. M., Klimaszewska, K. K., & Von-Aderkas, P. (2010). Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 100(3), 241-254.
- Bonga, J. M. (2016). Can explant choice help resolve recalcitrance problems in *in vitro* propagation, a problem still acute especially for adult conifers?. *Trees*, 1-9. Canada: Springer.
- Bonga, J. M., & Von-Aderkas, P. (1993). Rejuvenation of tissues from mature conifers and its implications for propagation *in vitro*. In Ahuja, M. R., & Libby, W. J. (Eds.), *Clonal Forestry I* (pp. 182-199). Germany, Berlin: Springer.
- Burrows, G. E. (1990). Anatomical aspects of root bud development in hoop pine (*Araucaria cunninghamii*). *Australian Journal of Botany*, 38(1), 73-78.
- Climent, J., López, R., González, S., & Gil, L. (2006). El pino canario (*Pinus canariensis*), una especie singular. *Revista Ecosistemas*, 16(1), 80-89.
- Cortizo, M., de Diego, N., Moncaleán, P., & Ordás, R. J. (2009). Micropropagation of adult stone pine (*Pinus pinea* L.). *Trees*, 23(4), 835-842.
- Chang, S. H., Ho, C. K., Chen, Z. Z., & Tsay, J. Y. (2001). Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. *Plant Cell Reports*, 20(6), 496-502.
- Day, M. E., & Greenwood, M. S. (2011). Regulation of ontogeny in temperate conifers. In Meinzer, F. C., Lachenbruch, B., & Dawson T. D. (Eds.), *Size-and age-related changes in tree structure and function* (pp. 91-119). EUA: Springer Netherlands.
- De-Diego, N., Montalbán, I. A., Fernández de Larrinoa, E., & Moncaleán, P. (2008). *In vitro* regeneration of *Pinus pinaster* adult trees. *Canadian journal of forest research*, 38(10), 2607-2615.
- De-Feria, M., Chávez, M., Barbón, R., La, M., Pérez, M., Jiménez-Terry, F., ... & Agramonte, D. (2009). Multiplicación *in vitro* de plantas de *Pinus caribaea* var. *caribaea*. *Biotecnología vegetal*, 9(4), 217-224.

- Del-Tredici, P. (2001). Sprouting in temperate trees: a morphological and ecological review. *The botanical review*, 67(2), 121-140.
- García, J. L., Avidan, N., Troncoso, A., Sarmiento, R., & Lavee, S. (2000). Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues. *Scientia horticultrae*, 85(4), 271-284.
- Giri, C. C., Shyamkumar, B., & Anjaneyulu, C. (2004). Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees*, 18(2), 115-135.
- Greenwood, M. S. (1995). Juvenility and maturation in conifers: current concepts. *Tree Physiology*, 15(7-8), 433-438.
- Greenwood, M. S., & Hutchison, K. W. (1993). Maturation as a developmental process. In Ahuja, M. R., & Libby, W. J. (Eds.), *Clonal Forestry I* (pp. 14-33). Germany, Berlin: Springer.
- Hartmann, T. H., Kester, E. D., Davies, Jr. T. F. & Geneve, L. R. (2011). *Plant propagation principles and practices* (18 va ed.). New Jersey, EUA: Prentice Hall. 915 p.
- Hevia, A. (2013). *Influencia de la poda en el desarrollo de masas de Pinus radiata D. Don y Pinus pinaster Aiton en Asturias*. Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Galicia, España.
- Hernández, Y., & González, M. E. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4).
- Jasso, M. J., López, U. J., Jiménez, C. M., & Jacob, C. V. (1993). Evaluación fenológica vegetativa de *Pinus leiophylla* en un huerto semillero. In: SOMEFI (Ed.), *I Congreso Mexicano Sobre Recursos Forestales* (pp. 97-98). Saltillo, Coahuila, México: Autor.
- Jiménez, C. M., & Zwiazek, J. J. (2014). Adventitious sprouting of *Pinus leiophylla* in response to salt stress. *Annals of Forest Science*, 71(7), 811-819.
- Lapp, M. S., Malinek, J., & Coffey, M. (1996). Microculture of western white pine (*Pinus monticola*) by induction of shoots on bud explants from 1-to 7-year-old trees. *Tree physiology*, 16(4), 447-451.
- López, M. R. G., Sospedra, R. S., Suarez, S. G., & Jiménez, A. L. N. (2003). Utilización de brotes epicórmicos para la propagación clonal *in vitro* de *Eucalyptus saligna*. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 239-244.
- Malabadi, R. B., & Van-Staden, J. (2005). Role of antioxidants and amino acids on somatic embryogenesis of *Pinus patula*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(2), 181-186.
- Martínez, T., Vidal, N., Ballester, A., & Vieitez, A. M. (2012). Improved organogenic capacity of shoot cultures from mature pedunculate oak trees through somatic embryogenesis as rejuvenation technique. *Trees*, 26(2), 321-330.
- Mikhalevskaya, O. B., & Shabasheva, A. A. (2013). Cyclic rejuvenation in the development of shoots of Canary Island pine (*Pinus canariensis* C. Sm.). *Russian journal of developmental biology*, 44(1), 19-27.
- Morisset, J. B., Mothe, F., Chopard, B., François, D., Fontaine, F., & Colin, F. (2012). Does past emergence of epicormic shoots control current composition of epicormic types?. *Annals of forest science*, 69(2), 139-152.
- Nadgauda, R. S., Nagarwala, N. N., Parasharami, V. A., & Mascarenhas, A. F. (1993). Bud break and multiple shoot formation from tissues of mature trees of *Pinus caribaea* and *Pinus kesiya*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 29(3), 131-134.

- Niemi, K., & Scagel, C. (2007). Root Induction of *Pinus Sylvestris* L. Hypocotyl Cuttings using Specific Ectomycorrhizal Fungi *in Vitro*. In *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits* (pp. 147-152). Springer Netherlands.
- Orlikowska, T., Nowak, K., & Reed, B. (2016). Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-22.
- Parasharami, V. A., Poonawala, I. S., & Nadgauda, R. S. (2003). Bud break and plantlet regeneration *in vitro* from mature trees of *Pinus roxburghii* Sarg. *Current Science-Bangalore*, 84(2), 203-207.
- Perry, Jr. P. J. (1991). *The Pines of Mexico and Central America*. Oregon, EUA: Timber Press. 231 p.
- Pirttilä, A. M., Podolich, O., Koskimäki, J. J., Hohtola, E., & Hohtola, A. (2008). Role of origin and endophyte infection in browning of bud-derived tissue cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95(1), 47-55.
- Pirttilä, A. M., Pospiech, H., Laukkanen, H., Myllylä, R., & Hohtola, A. (2003). Two endophytic fungi in different tissues of Scots pine buds (*Pinus sylvestris* L.). *Microbial ecology*, 45(1), 53-62.
- Quine, C. P. (2004). Development of epicormic sprouts on Sitka spruce stems in response to windthrown gap formation. *Forestry*, 77(3), 225-233.
- Rodríguez-Banderas, A., Vargas-Mendoza, C. F., Buonamici, A., & Vendramin, G. G. (2009). Genetic diversity and phylogeographic analysis of *Pinus leiophylla*: a post-glacial range expansion. *Journal of biogeography*, 36(9), 1807-1820.
- Rodríguez, R., Valledor, L., Sánchez, P., Fraga, M. F., Berdasco, M., Hasbún, R., ... & Ríos, D. (2007). Propagation of Selected *Pinus* Genotypes Regardless of Age. In *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits* (pp. 137-146). Springer Netherlands.
- Sampayo, M. S., Jasso, M. J., Jiménez, C. M., López, U. J., Castillo, M. C., & Sánchez, M. V. (2016). Efecto del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de genotipos de *Cedrela odorata* L. *Agroproductividad*, 9(2), 62-69.
- Sánchez, R. G. (2016). *Clonación de progenies de árboles selectos de un huerto semillero sexual de Pinus leiophylla Schiede ex Schltdl. & Cham*. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Texcoco, Edo. de México, México. 91 p.
- Selby, C., Watson, S., & Harvey, B. M. (2005). Morphogenesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) bud cultures—tree maturation and explants from epicormic shoots. *Plant cell, tissue and organ culture*, 83(3), 279-285.
- Singh, A. (2015). Micropropagation of plants. In Bahadur, B., Rajam, M. V., Sahijram, L., & Krishnamurthy, K. V. (Eds.) *Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant genomics and biotechnology* (pp. 329-346). India. Springer.
- Tang, W., & Newton, R. J. (2004). Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science*, 167(3), 621-628.
- Valladares, S., Sánchez, C., Martínez, M. T., Ballester, A., & Vieitez, A. M. (2006). Plant regeneration through somatic embryogenesis from tissues of mature oak trees: true-to-type conformity of plantlets by RAPD analysis. *Plant cell reports*, 25(9), 879-886.
- Van-Staden, J., Zazimalova, E. & George E. F. (2008). Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J (Eds.). *Plant propagation by tissue culture* (pp. 205-226). Springer Netherlands.
- Wendling, I., Trueman, S. J., & Xavier, A. (2014). Maturation and related aspects in clonal forestry—part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. *New Forests*, 45(4), 473-486.

- Zhang, H., Horgan, K. J., Reynolds, P. H. S., & Jameson, P. E. (2003). Cytokinins and bud morphology in *Pinus radiata*. *Physiologia Plantarum*, 117(2), 264-269.
- Zhu, L. H., Wu, X. Q., Qu, H. Y., Ji, J., & Ye, J. R. (2010). Micropropagation of *Pinus massoniana* and mycorrhiza formation *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 102(1), 121-128.