Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

REJUVENECIMIENTO DE CEDRO ROJO (*Cedrela odorata* L.), MEDIANTE MICROINJERTACIÓN E INJERTACIÓN

Tesis que presenta

JUAN JUÁREZ GÓMEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Opción Biotecnología

Mérida, Yucatán, México

Enero de 2013

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

PRELIVEMECIMIENTO DE CEDRO ROLO (Cedrela odorata L.), MEDIANTE MICROINUERTACIÓN E INUERTACIÓN

Tesis que presenta

JUAN JUÁREZ GÓMEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Opción: Biotecnología

Mérida, Yucatán, México

Enero de 2013

CICY

RECONOCIMIENTO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado Rejuvenecimiento de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.), mediante microinjertación e injertación fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Manuel L Robert Díaz, dentro de la Opción Maestría, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota
Coordinador de Docencia
Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

Mérida, Yucatán México a 15 de Enero 2013

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del centro de investigación Científica de Yucatán, A:C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si deriven de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

IBQ. Juan Juárez Gómez

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca de manutención (240245).

Al Centro de investigación Científica de Yucatán por permitirme realizar este trabajo es sus instalaciones específicamente en la unidad de biotecnología y a los profesores con quienes tuve la oportunidad de interactuar gracias por su experiencia y conocimientos compartidos.

A mi asesor Dr. Manuel L. Robert por el apoyo académico y económico que hicieron posible la realización del presente trabajo.

A mi co-acesor Dr. Yuri Jorge Peña Ramírez

A los miembros de mi comité tutorial Dr. Manuel L. Robert Dr. Yuri Jorge Peña Ramírez Dra. Nancy Santana Buzzy, Dr. Roger Orellana Lanza, por sus observaciones y críticas en los exámenes de avances.

A mi comité evaluador integrado por la Dra. Nancy Santana Buzzy, Dra. Clelia De la Peña Seaman, Dr. Roger Orellana Lanza, Dr. Yuri Jorge Peña Ramírez y el Dr. Manuel L. Robert, por las valiosas observaciones a la redacción del trabajo.

Al técnico M.C. Miguel A. Herrera Alamillo por el apoyo brindado en la toma de fotografías.

Al técnico M.C. Andrés Quijano Ramayo por el apoyo brindado en la desinfestación del material vegetal.

A la Comisión Nacional Forestal por el material vegetal (semillas y plantas de cedro rojo) donados.

A mis compañeros de laboratorio por el apoyo brindado durante la realización del presente trabajo.

Al Sr. Pablo Juárez Silva por permitir realizar las colectas del material experimental en sus árboles de cedro rojo.

DEDICATORIA

A mi familia pilar fundamental en mi vida, gracias por su amor.

INDICE i

LISTADO DE ABREVIATURAS ii

LISTA DE FIGURAS iii

LISTA DE CUADROS iv

RESUMEN 1

ABSTRACT 3

INTRODUCCIÓN 5

CAPITULO I: ANTECEDENTE 7

1.1 El Cedro rojo 7
1.1.1 Descripción botánica taxonómica 7
1.1.2 Distribución geográfica 9
1.1.3 Usos e importancia de la especie 10
1.2 Uso para plantaciones comerciales 11
1.2.1 Problemáticas del cultivo 11
1.2.2 Mejoramiento genético forestal 12
1.3 Técnicas biotecnológicas como alternativas para el mejoramiento genético forestal 13
1.3.1 Cultivo de tejidos vegetales 13
1.3.2 Medios de cultivo 14
1.4 Reguladores de crecimiento vegetal 14
1.4.1 Micropropagación 15
1.4.2 Uso de injertación y microinjertación para el rejuvenecimiento vegetal 16
1.4.4 Antecedentes del cultivo *in vitro* de cedro rojo 17
1.5 Justificación 19
1.5.1 Hipótesis 20
1.8 Objetivos 20
1.8.1 Objetivo general 20
1.8.2 Objetivos específicos 20
1.9 Estrategia experimental 21
1.10 Referencias Bibliográficas 22

CAPITULO II: SELECCIÓN DE ÁRBOLES ÉLITE DE CEDRO ROJO, COLECTA DE VARETAS Y ESTABLECIMIENTO BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO 27

2.1 Introducción 27
2.2 Materiales y métodos 29
2.2.1 Descripción de área de muestreo 29
2.2.2 Selección de árboles de cedro rojo 30
2.2.3 Colecta y transporte de varetas 30
2.2.4 Establecimiento de varetas bajo condiciones de invernadero para enraizamiento y obtención de brotes 31
2.3 Resultados y Discusión 33
2.3.1 Selección de árboles élite 33
2.3.2 Colecta y transporte de varetas 35

2.3.3 Emisión de brotes y raíces en varetas 36
2.4 Conclusiones 40
2.5 Referencias Bibliográficas 41

CAPITULO III: INJERTO Y MICROINERTO COMO MEDIO PARA REVERTIR CAMBIO DE FASE (adulto - juvenil) EN ÁRBOLES ADULTOS DE CEDRO ROJO (*Cedrela odorata* L.) 43

3.1 Introducción 43
3.2 Materiales y métodos 45
3.2.1 Material vegetal 45
3.2.2 Injerto bajo condiciones de invernadero 45
3.2.3 Microinjertación *in vitro* 46
3.2.4 Evaluación del prendimiento y asepsia del cultivo 49
3.2.5 Análisis histológico de los microinjertos 50

3.3 Resultados y discusión 51
3.3.1 Injerto bajo condiciones de invernadero 51
3.3 3 Material injertado vs material no injertado 54
3.3.4 Microinjertos 56
3.3.5 Análisis histológico de los microinjertos 61
3.3.6 Conclusiones 63
3.3.7 Perspectivas 64
3.4 Referencias Bibliográficas 65

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Cedro rojo (*Cedrela odorata*, L) 9
Figura 2. Mapa de distribución geográfica de cedro rojo en México 10
Figura 3. Ubicación del area de muestreo en el estado de Veracruz 29
Figura 4: Árboles seleccionados de cedro rojo 34
Figura 5: Colecta de varetas 35
Figura 6. Inducción de yemas y enraizamiento en varetas cultivadas en distintos tipos de sustratos bajo condiciones de invernadero 38
Figura 7: Varetas establecidas en agua. 39
Figura 8: Proceso para la injertación de cedro rojo 46
Figura 9: Preparación del injerto y portainjerto para la microinjertación 48
Figura 10: Proceso para la microinjertación 49
Figura 11: Injertos de cedro rojo 53
Figura 12: Injertos de ocho semanas de edad 54
Figura 13: Injerto y varetas de ocho semanas de cultivo 56
Figura 14: Microinjerto a dos semanas de iniciado el cultivo 59
Figura 15: Microinjerto de cinco semanas 60
Figura 16: Análisis histológico del microinjerto 61

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1: Ejemplo de las etapas fenológicas de (Cedrela odorata L.) en la zona sur de Veracruz 8
Tabla 2: Resumen de los principales reguladores de crecimiento vegetal 15
Tabla 3: Diferentes tratamientos para la emisión de brotes y raiz en varetas 32
Tabla 4. Descripción de los árboles seleccionados en la localidad de Comején municipio de Acayucan Veracruz. 33
Tabla5: Porcentajes de emisión de brotes en varetas establecidas bajo diferentes sustratos 36
Tabla 6: Tratamientos de antimicrobianos aplicados a brotes de *C. odorata* para la microinjertación 47
Tabla 7: Prendimiento a las dos, cuatro y ocho semanas después de la injertación 51
Tabla 8: Porcentaje de contaminación en microinjertos en diferentes tratamientos de desinfestación. 58

RESUMEN

Cedrela odorata L. comúnmente conocido como cedro rojo, es una especie de árbol maderable tropical y debido a las características de su madera tales como: color, durabilidad y aroma, está considerada entre las maderas preciosas y más valiosas del mercado.

Sin embargo, esta especie presenta una serie de problemas para su explotación como la falta de líneas o variedades domesticadas "élite" debido, principalmente, a la pérdida de los mejores individuos (fustes rectos y anchos) que son destinados indiscriminadamente a aserrío, empobreciendo de esta manera el germoplasma de los bosques. La poca capacidad de dispersión de las semillas, ocasiona problemas de regeneración natural. Por otro lado, el ataque del barrenador *Hypsipyla grandella* (Zeller) afecta severamente a los árboles en sus primeros años de vida, limitando grandemente el establecimiento de plantaciones comerciales de esta especie. Todos estos problemas, hacen necesario desarrollar técnicas de propagación vegetativa eficaces que permitan la conservación de los recursos genéticos y la mejora de la especie.

Este trabajo se centra en el establecimiento de metodologías como la injertación y microinjertación como vía para el rejuvenecimiento y posterior regeneración clonal de árboles de cedro rojo adultos. Para ello se seleccionaron individuos adultos en campo que presentan características superiores (longitud y diámetro de fuste). Se colectaron varetas de la copa de los mismos las cuales fueron establecidas bajo condiciones de invernadero con el objetivo de inducir la brotación de raíz y de yemas latentes experimentando sustratos sólidos, líquidos y enraizadores de tipo comercial. Los resultados muestran que la proliferación de yemas es mejor en los sustratos líquidos y que los enraizadores no presentan ningún efecto favorable en cuanto a la emisión de raíz en las varetas.

Respecto a la injertación de material adulto sobre portainjertos juveniles, se obtuvo un alto porcentaje de prendimiento mediante la técnica de púa, además de que fue posible inducir un cierto grado de rejuvenecimiento al material adulto lo cual se pudo observar en el crecimiento vigoroso y la incapacidad de floración de los injertos. En cuanto a la microinjertación previo a realizarse los brotes obtenidos de las varetas fueron sometidos a procesos de desinfestación logrando un porcentaje de material aséptico del 40 % cuando este fue lavado con Tween 80, seguido de lavados con (CaOCl) al 10 % (p/v) durante 10 min y posterior tratamiento con el fungicida comercial Switch a 2 $g \cdot L^{-1}$ durante 30 minutos. Por último un tratamiento con el antibiótico Bencilpenicilina de 400 000 $UI \cdot L^{-1}$, de igual manera que en la injertación se obtuvo un porcentaje de prendimiento superior al 90 %. Lo cual fue constatado mediante el análisis histológico en el que se evidencia una clara conexión vascular entre los tejidos injertados.

Estos resultados permitirán el establecimiento de propágulos en invernadero, mediante injertación de material seleccionado en campo, mismos que pueden ser sometidos a pre tratamientos de asepsia que facilite su posterior establecimiento *in vitro*.

ABSTRACT

Cedrela odorata L., commonly known as red cedar, is a tropical timber tree which is in high demand in the international hardwoods markets.

However, the commercial exploitation of this species presents several problems because it has not been properly domesticated and it is mainly extracted by indiscriminate logging from natural populations. This has severely diminished the availability of high quality individuals (stems straight and wide) and has impoverished the forest "elite" germplasm. Another serious problem is the attack of the borer *Hypsipyla grandella* (Zeller) which affects trees in their first years of life, greatly limiting the establishment of commercial plantations of this species.

All these problems make it necessary to develop effective vegetative propagation techniques that enable the conservation of genetic resources and the improvement of the species.

This work focuses on the development of methodologies such as grafting and micrografting for rejuvenation and regeneration of selected elite clonal adult red cedar trees. Adult individuals with superior characteristics (length and stem diameter) were selected and the scions collected from the same cup were established under greenhouse conditions in order to induce root sprouting of dormant buds. Several substrates and conditions were tested

The grafting of adult material on juvenile rootstocks showed a high survival percentage when the barbed technique was used and it was possible to induce some degree of rejuvenation of the adult materials as observed in the fast growth and labscence of flowering of the grafts.

Regarding the micrografting technique, the braces obtained were disinfested with Tween 80, followed by washings (CaOCl) to 10% (w / v) for 10 min and subsequent treatment with the commercial fungicide Switch to 2 g • L -1 for 30 minutes achieving an aseptic material percentage of 40%. An additional treatment with 400 000 IU benzylpenicillin • L-1, increased the grafting success to over 90%. This was confirmed by histological analysis which shows a clear connection between the vascular tissues. These results permit the establishment of propagules in the greenhouse, by grafting field selected material to facilitate its subsequent establishment in *in vitro* culture.

INTRODUCCION

El cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) es la segunda de las especies maderables tropicales preciosas más importantes, después de la caoba (*Swietenia macrophyla* King) para la industria forestal. Su valor comercial alcanza hasta 15 veces más, que el de otras especies forestales (coníferas), lo cual se debe principalmente a las características de su madera: como dureza, color, durabilidad y aroma (Simula *et al.*, 2005, ITTO, 2010). Su madera es utilizada para la confección de muebles finos de alta calidad, esculturas, construcción de barcos, paneles decorativos, confección de cajas para puros, instrumentos musicales, ebanistería fina, etc. (Edmods, 1993; Blundell y Gullison, 2003).

Además, dado a su importancia comercial y efectos restauradores al medio ambiente, esta especie es ampliamente preferida para el establecimiento de plantaciones comerciales (CONAFOR, 2007). Sin embargo, presenta una serie de problemas que limitan su explotación comercial como son: la falta de líneas o variedades domesticadas "élite" debido, a la pérdida de los mejores individuos (fustes rectos y anchos) que han sido destinados indiscriminadamente a aserrío, empobreciendo de esta manera el germoplasma de los bosques y la poca capacidad de dispersión de las semillas, lo que ocasiona problemas de regeneración natural (Newton *et al.*, 1993a).

El ataque del barrenador *Hypsipyla grandella* Zeller. Esta polilla, cuyas larvas se alimentan de los brotes apicales de los árboles jóvenes, causan la bifurcación y ramificación lateral de los individuos, haciéndolos inadecuados para la industria de la madera. De esta manera se ha visto limitado grandemente el establecimiento de plantaciones comerciales con cedro rojo, (Keay, 1996; Briceño-Vergara 1997; Valera 1997; O'Neil et al. 2001, Peña-Ramírez *et al.*, 2010).

La propagación vegetativa ha tenido un papel importante en la multiplicación de árboles "élite" (Ivanova, 1981/Cit. por Roca y Mroginski, 1991). En este contexto la biotecnología puede ser una alternativa importante para regenerar y multiplicar especies forestales que de otra manera sería difícil y lento el proceso de regeneración (Torpe *et al.*, 1991).

Sin embargo la multiplicación de las especies agroforestales es normalmente un proceso lento, en tanto que el ciclo de vida de los árboles es largo. Así, la

multiplicación de árboles adultos, o bien presenta serias dificultades o es virtualmente imposible como ocurre en la mayoría de las especies arbóreas (Lambers y Colmer, 200). Por ello los programas forestales de mejora se encuentran con el gran problema de tener que seleccionar los caracteres de interés en la madurez, mientras que la propagación vegetativa de los mismos es solo posible durante la fase juvenil de desarrollo, debido a que a lo largo de la maduración se produce un declive en su capacidad morfogénica, lo que con frecuencia es una barrera para la multiplicación o regeneración de la planta (Rodríguez *et al*, 2005).

El injerto *in vivo* y microinjerto *in vitro* pueden ser soluciones al enraizamiento deficiente y a la falta de vigor que muestran los brotes provenientes de árboles adultos de muchas especies leñosas (Fraga *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2005). El microinjerto permite la revigorización de yemas vegetativas ontogénicamente adultas sobre portainjertos juveniles, que se corresponde con detección de patrones proteicos característicos de individuos juveniles (Zapata, 2002). Además, tiene la capacidad potencial para inducir reversión de características fenotípicas del estado adulto a estados más juveniles, haciendo posible la recuperación de explantes, lo que facilita la manipulación de sus capacidades morfogénicas y, por lo tanto, la clonación de materiales adultos seleccionados (Huang, 1992; Fraga *et al.*, 2002)

El propósito del presente trabajo fue establecer las metodologías de injertación y microinjertación para inducir rejuvenecimiento del material adulto seleccionado que facilite el posterior establecimiento *in vitro* de muestras seleccionadas de Cedrela odorata.

CAPÍTULO I
ANTECEDENTES

1.1 El Cedro rojo

El cedro rojo (*Cedrela odorata* L) es un árbol tropical, de la familia Meliaceae, solo después de la caoba (*Swietenia macrophylla* K.) es la especie más importante económicamente. Su madera ha abastecido el mercado internacional en los últimos 200 años, bajo el nombre de *Spanish cedar* o *West Indian cedar* (Albert *et al.*, 1995). Sin embargo; pese a su importancia económica, el cedro rojo ha sido severamente afectado por la selección disgénica y la deforestación, a tal grado que sus poblaciones naturales han sido fragmentadas y disminuidas (Patiño, 1997). *Cedrela odorata* está incluida en la lista de especies prioritarias de la Convención para el Comercio Internacional de Especies de Flora y Fauna en Peligro de Extinción (CITES). Por esta razón, su conservación, propagación y uso sostenible cobran gran importancia (Patiño, 1997).

1.2 Descripción Botánica y Taxonómica

El cedro rojo es una especie caducifolia que puede alcanzar hasta 30 m de altura y diámetros del tronco, de hasta 1.50 m. Es de copa redondeada, de follaje ralo que se defolia a finales de la estación seca (febrero a abril). Presenta raíces extendidas y superficiales; el tronco es cilíndrico de corteza gruesa, color gris-marrón, fisurada, con grietas profundas. La corteza interior es rosa por fuera y blanca por dentro con olor y sabor a ajo (Pennington y Sarukhán, 1968).

Al igual que otras meliáceas, el cedro rojo es monoica (flores unisexuales), (Pennington *et al.*, 1981); polinizadas por abejas pequeñas, avispas y polillas, (Navarro *et al.* 2002, Bawa *et al.*, 1985). Las flores son pequeñas, de color blanco a crema verdoso, con cinco pétalos y cinco estambres, forman inflorescencias terminales, agrupadas en racimos florales, de 15 a 30 cm de longitud. El árbol florece entre los meses de mayo a junio formando una cápsula leñosa, elipsoide, de 2.5 a 5 cm de largo con cinco gajos (valvas) que contienen entre 25 y 40 semillas aladas que maduran entre los meses de marzo y abril (Figura 1) (Pennington y Sarukhán, 1968).

Tabla 1. Ejemplo de las etapas fenológicas de (*Cedrela odorata*) en la zona sur de Veracruz.

ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
					Floración						
									Fruto inmaduro		
		Fructificación y dispersión									
							Con follaje				
		Sin follaje									

De acuerdo a (Cronquist, 1981), el cedro rojo se clasifica de la siguiente manera

División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsidae
Subclase:	Rosidae
Orden:	Sapindale
Familia:	Meliaceae
Género:	*Cedrela*
Especie:	*Cedrela odorata*

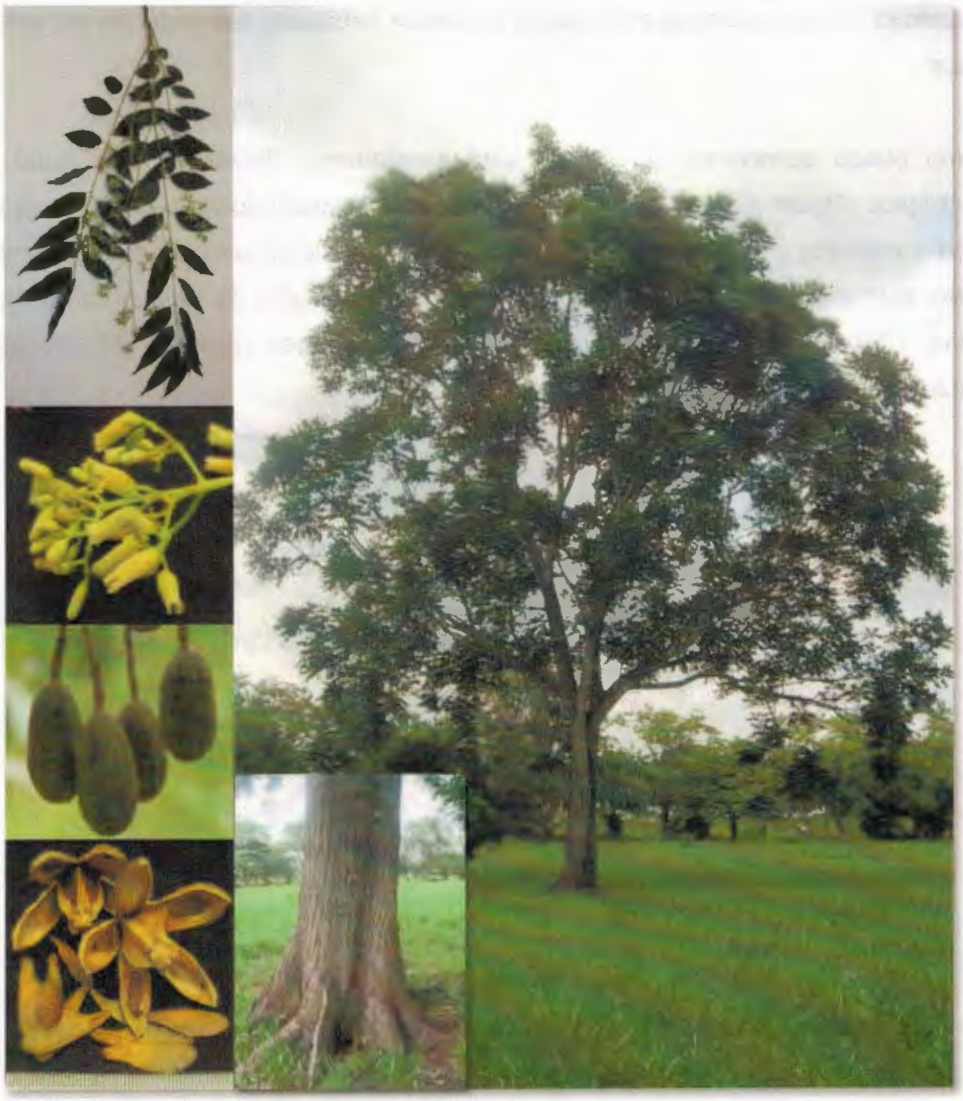


Figura 1: Cedro rojo (*Cedrela odorata*). En la figura se muestran distintas partes de este árbol como son el tronco, las ramas con flores, las inflorescencias, los frutos cerrados y los frutos abiertos con semillas.

1.2.1 Distribución geográfica

El cedro rojo se encuentra distribuído desde el norte de México, pasando por Centroamérica e islas de El Caribe, hasta Brasil. Crece en climas y subtropicales húmedos y semihúmedos y cubre desde localidades al nivel del mar en varios países hasta cerca de los 3,000 metros sobre el nivel del mar en Bolivia (Lam, 1968). En Chiapas, México, *C. odorata* crece desde el nivel del mar hasta los 1,800 msnm

(Ocosingo, Chiapas), donde se le puede encontrar habitando con especies del género *Pinus*.

Como puede observarse *C. odorata* está ampliamente distribuida a lo largo del Neotrópico (Figura 2), esta especie forma parte de bosques donde los individuos son poco numerosos y se encuentran dispersos entre sí. Se le encuentra por lo general en suelos bien drenados. La especie tolera prolongados períodos de sequía (Lamb, 1968; Salas, 1993) y se desarrolla también en suelos de origen volcánico (Pennington y Sarukhán, 1968).

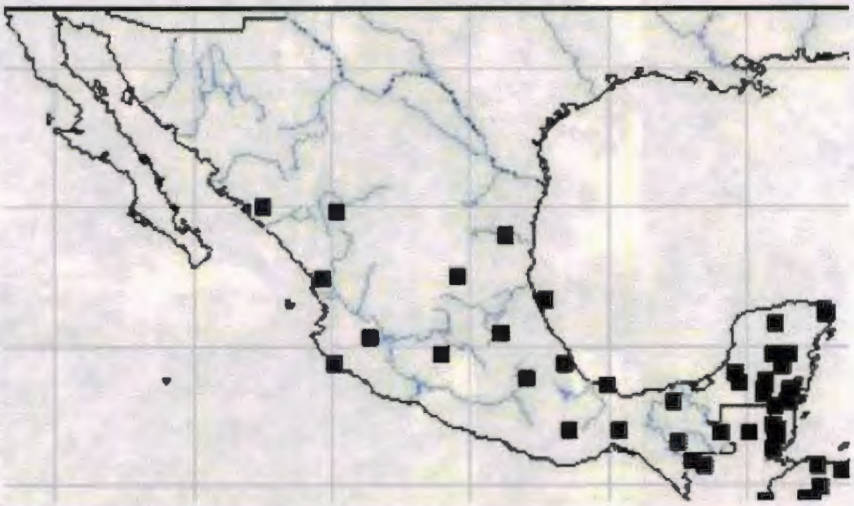


Figura 2. Mapa de distribución geográfica de cedro rojo en México. Los cuadros en negro indican los sitios en donde se encuentra esta especie. El cedro rojo se localizan en la vertiente del Golfo desde el sur de Tamaulipas., sureste de San Luis Potosí y las Huastecas hasta el norte de Chiapas., la selva Lacandona, la depresión central de Chiapas y la península de Yucatán, y en el Pacífico desde Sinaloa hasta Jalisco, Colima y en la costa de Chiapas.

1.2.2 Usos e importancia de la especie

La madera del cedro rojo es preferida en los mercados de todo el mundo debido a su agradable aroma y fácil manejo, además de que presenta resistencia al ataque de insectos y a la pudrición. Se utiliza ampliamente en carpintería y ebanistería fina (Lam, 1968). Su importancia económica es tal que los precios de esta madera pueden superar hasta cinco veces más el valor de otras maderas (coníferas), (OIMT, 2009).

1.2.3 Uso para plantaciones forestales

De acuerdo con el Programa Estratégico Forestal para México (PEF 2025), la búsqueda del desarrollo forestal sustentable es una prioridad en el mediano y largo plazo; las políticas y programas contenidos en éste así lo establecen. En el PEF 2025 se destaca la importancia de las Plantaciones Forestales Comerciales (PFC) con el objetivo de aumentar la producción maderable para el abastecimiento de la industria forestal, reducir la presión sobre los bosques naturales, fomentar la inversión privada y social en el sector forestal, y convertir áreas degradadas o improductivas en bosques productivos, contribuyendo de paso al mejoramiento del ambiente en general (CONAFOR, 2007)

En México la superficie cubierta por PFC de diversas especies a nivel nacional alcanza aproximadamente 117,479 Ha, de las cuales las especies maderables representan un 85.2%, distribuidas básicamente en los estados de Veracruz, Tabasco y Campeche, siendo el cedro rojo y el eucalipto, las especies que mayormente se han plantado (CONAFOR, 2007).

De acuerdo a datos de (FUMIAF-SAGARPA, 2005) el cedro rojo representa una importante oportunidad de negocio en México lo cual ha propiciado que en los últimos años en nuestro país esté proliferando el establecimiento de plantaciones forestales con esta especie.

Hasta ahora, el comercio de esta madera ha sido un buen negocio para los productores que exportan a EEUU cortes de madera que se cotiza en 2,000 pesos por m^3 o en forma de muebles en los que cada m^3 se tasa en 14,000 pesos (CONAFOR, 2007).

1.3 Problemáticas del cultivo

En las últimas décadas el cedro rojo ha sufrido la disminución del tamaño de sus poblaciones debido a diversos factores, resaltando entre ellos los procesos de deforestación, el aprovechamiento selectivo sobre los mejores individuos y la falta de tecnologías para su reproducción eficiente, lo cual ha afectado directamente la constitución genética de las poblaciones haciendo que cada vez sea más difícil localizar árboles con características comerciales (Albert *et al*, 1995). Las plantaciones forestales comerciales representan una alternativa para restar presión a los bosques

naturales, sin embargo la falta de material propagativo de calidad (élite) destinado al establecimiento de plantaciones altamente rentables ha propiciado en gran medida el fracaso de las mismas (CONAFOR, 2007). Tomando en consideración que las plantaciones forestales se consideran como una inversión de largo plazo, es necesario contar con un germoplasma mejorado (Patiño, 1993).

Por otro lado, existe el problema que presenta esta especie al ataque del barrenador de las meliáceas *Hypsiphyla grandella* Zellar (Insecta: Pyralidae). Esta polilla, en su fase de larva se alimenta de los meristemos apicales de árboles jóvenes, e induce una ramificación lateral resultando que el fuste de los árboles se deforme haciéndolo inadecuado para la industria de la madera (Keay, 1996; Briceño-Vergara 1997; Patiño-Valera 1997; O'Neil et al. 2001, Peña-Ramírez *et al.,* 2010).

1.4 Mejoramiento genético forestal

El Mejoramiento Genético Forestal (MGF) consiste en el desarrollo de poblaciones (poblaciones mejoradas) o individuos (individuos mejorados) en los que se encuentran perfectamente expresados los caracteres deseados, a partir de poblaciones amplias y diversas (poblaciones base) de especies forestales y su uso operacional como semillas, a partir de poblaciones madre de producción semillera o de clones mediante multiplicación vegetativa (White, 1987).

La finalidad de un programa de MGF es la de mejorar las principales características agronómicas; cuantitativas y cualitativas de rendimiento y calidad de los individuos, así como garantizar la seguridad de cosecha a través de la selección de genotipos deseables y su perpetuación mediante la utilización de semillas o clones seleccionados. Gracias a la mejora genética pueden lograrse, entre otras cosas, mayor productividad por hectárea, mejor calidad del producto, mayor adaptación a áreas marginales de cultivo, reducción del turno de aprovechamiento y de los costos de establecimiento, una mejor cosecha, y/o procesos industriales. Esto lleva a considerar al MGF como una herramienta operacional de uso corriente tal como las prácticas silviculturales (Zobel, B. J y Talbert, J. 1984).

Sin embargo uno de los problemas asociados al MGF es el tiempo requerido para la evaluación de los materiales obtenidos, debido a la longevidad de estas especies (Vargas y Adams, 1992). Las herramientas de biotecnología vegetal representan una alternativa eficiente para acelerar los procesos del MGF (Jeffrey y Dean *et al.*, 1997).

1.4.1 Técnicas biotecnológicas como alternativas para el mejoramiento genético forestal.

La biotecnología vegetal constituye un conjunto de técnicas como: el cultivo de tejidos vegetales, la genética molecular y la ingeniería genética; entre otras, que pueden complementar y apoyar los programas de MGF (Cheliak y Rogers, 1990). Esto principalmente debido a que las herramientas biotecnológicas representan una gran ventaja sobre el mejoramiento genético tradicional de árboles forestales (Ostry y Michler, 1993). Como una alternativa a las técnicas de la silvicultura clásica, la silvicultura clonal, en particular la propagación *in vitro* ofrecen la posibilidad de propagar de una manera rápida plantas élites implicando la producción de progenies genéticamente idénticas al progenitor (Giri *et al.*, 2004; Robert *et al.*, 2006b; Peña-Ramírez *et al.*, 2010). Recientemente se han empleado, técnicas de cultivo de tejidos vegetales en investigaciones para la conservación de reservas de árboles forestales y programas de manejo forestal (Vengadeson *et al.*, 2002).

1.4.2 Cultivo de Tejidos vegetales.

Dentro de la biotecnología moderna, el cultivo de tejidos vegetales (CTV) puede ser definido como el cultivo axénico de todo tipo de células, órganos, tejidos y embriones de una planta. El CTV comprende una amplia gama de técnicas, métodos y estrategias *in vitro* que son parte del grupo de tecnologías biotecnológicas (Smith y Drew, 1990).

El CTV ha sido utilizado para mejorar la sanidad incrementar el material vegetativo disponible. (George y Sherrington, 1984) Actualmente hay protocolos de cultivo de tejidos desarrollados para la mayoría de las especies, aunque continúan optimizándose. El material vegetal o explante con el que se inicia un cultivo *in vitro* puede ser cualquier célula, tejido u órgano de la planta. Se puede partir de fragmentos de tallo, raíz, hoja, meristemo, embriones, es decir de tejidos somáticos, pero también se puede iniciar a partir de células o tejidos no somáticos: anteras, polen, óvulos, etc. Según sea el explante utilizado se hablará de cultivo de secciones nodales, cultivo de hoja, de meristemo, de polen, de embriones, etc. (Thorpe, 1991).

La regeneración de plantas a través del CTV requiere condiciones asépticas en un ambiente artificial que sería el medio de cultivo dentro de un recipiente cerrado y mantenido en condiciones de laboratorio.

1.4.3 Medios de cultivo

El medio de cultivo es el sustrato en el cual se desarrollan los órganos, células y tejidos luego de ser aislados de la planta madre el cual consiste en una combinación de nutrientes como son sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas, aminoácidos y agua suplementado con reguladores de crecimiento vegetal y ocasionalmente con otras sustancias (Murashige y Skoog, 1962).

Se han desarrollado muchas formulaciones de medios de cultivo. Sin embargo. El medio desarrollado por Murashige y Skoog, (1962) o medio MS, es muy usado, particularmente si el objetivo es regenerar plantas completas. Existen numerosas variaciones de este medio. Por ejemplo el medio B5 re desarrollado por (Gamborg *et al.*, 1968) o varios de sus derivados que han sido de un gran valor en el cultivo de células también es utilizado eficazmente en la regeneración de plantas. El medio Woody Plant Medium (WPM) (Mc Cown *et al.*, 1981) de baja concentración de sales que está especialmente indicado para especies leñosas.

1.4.3 Reguladores de crecimiento vegetal

Normalmente para la inducción de una respuesta morfogénica del explante, es necesario la adición de reguladores de crecimiento vegetal al medio de cultivo. Los reguladores de crecimiento vegetal fitorreguladores o fitohormonas son compuestos orgánicos que pueden producir efectos notables sobre el metabolismo y el crecimiento celular, aún en cantidades muy pequeñas se producen sobre todo en tejidos en crecimiento (meristemos de los ápices en desarrollo en el extremo de tallos y raíces) y suelen ejercer sus efectos en lugares alejados del lugar de producción (George y Sherrington, 1984)

Los reguladores de crecimiento son mensajeros que químicos ejercen diferentes efectos sobre el metabolismo y división celular en las plantas tales como: a) estimular el crecimiento longitudinal de las células en la parte de la planta que se encuentra en crecimiento; b) iniciar la formación de nuevas raíces, especialmente adventicias; c) iniciar el desarrollo de flores y frutos; d) inhibir el desarrollo de los brotes laterales; e) estimular la división celular en el cambium vascular y f) controlar la abscisión o caída de hojas, flores y frutos , etc. (George y Sherrington, 1984)

Tabla 2: Resumen de los principales reguladores de crecimiento vegetal empleados en Cultivo de Tejidos y sus mayores efectos (Duchefa, 2001).

FITOHORMONAS	MAYORES EFECTOS EN CTV.
AUXINAS Acido 3-indolacético: AIA Acido naftalenacético: ANA Acido indol 3-butírico: AIB Acido fenilacético: APA Acido 2,4 diclorofenoxiacético:2,4 D Acido2,4,5Triclorofenoxiacético: 2,4,5T Picloram Dicamba Acido clorofenoxiacético: ACP	Formación de raíces adventicias(a altas concentraciones.) Formación de brotes adventicios (a bajas concentraciones.) Inducción de embriones somáticos División celular Formación y crecimiento de callos Inhibición del desarrollo de yemas axilares. Inhibición del crecimiento de la raíz.
CITOKININAS Zeatina: Z Ribosido de la Zeatina: ZR Isopenteniladenina: IP Isopenteniladenosina: IPA 6 bencilaminopurina: BAP 6 furfurilaminopurina: KIN Thidiazuron: TDZ	Formación de raíces adventicias (a altas concentraciones) Inhibición de la formación de raíces. División celular Formación y crecimiento del callo. Estimulación del desarrollo de yemas auxiliares. Inhibición del alargamiento de los tallos Inhibición de la senescencia de la hoja.
GIBERELINAS Acido giberélico: GA_3 (giberelinas): GA_1, GA_4, GA_7	Alargamiento del tallo Ruptura de la dormancia de la semilla, embriones somáticos, yemas apicales y bulbos. Inhibición de la formación de raíces adventicias Regula la formación de tubérculos, cormos y bulbos.
ETILENO	Estimula la senescencia de las hojas Estimula la maduración de los frutos Promueve o inhibe la regeneración adventicia(en dependencia del tiempo de aplicación o del genotipo)
ACIDO ABSCÍSICO	Maduración de embriones somáticos Facilita la aclimatación Formación de bulbos y tubérculos Promueve el desarrollo de la dormancia

1.4.4 Micropropagación

La micropropagación es cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan un incremento en el número de propágulos como alternativa tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente (Villalobos y Thorpe, 1991).

Este procedimiento busca que cada una de las plántulas o propágulos que se produzcan, puedan crecer y ser fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta

original de la cual se derivan (Villalobos y Thorpe, 1991). Fragmentos de ápices muy jóvenes o meristemos se pueden cultivar en frascos o cajas de policarbonato se pueden obtener plantas a los tres o cuatro meses, con un estado sanitario controlado (Villalobos y Thorpe, 1991).

La micropropagación de especies arbóreas ofrece una vía rápida para producir a nivel industrial o semi industrial plantas clónales, producción de biomasa y conservación de germoplasma élite o de alto valor (Roul y Das, 1993). Asimismo, es una alternativa para la preservación de especies, pues se consigue aumentar las tasas de multiplicación de plántulas para suplir la demanda comercial disminuyendo la presión sobre las poblaciones naturales (Pinto *et al.*, 1995). Por ejemplo, Quraishi y Mishra, (1997), señalan que en seis meses pueden obtenerse alrededor de 1000 plantas a partir de un solo explante nodal de *Cleistanthus collinus* (Euphorbiaceae) mientras que Eswara *et al.,* (1997) citan que a partir de un explante foliar de nim (*Azadirachta indica*, Meliaceae) se pueden obtener aproximadamente 80 brotes en tres semanas, con un porcentaje de enraizamiento superior al 55%.

Sin embargo, el éxito de la propagación vegetativa de especies leñosas disminuye a medida que el árbol crece y se presenta el cambio de fase, de juvenil a fase madura (Fraga *et al.*, 2002), lo cual afecta la capacidad de enraizamiento del material vegetal (Salisbury y Ross 2000; Rodríguez *et al.*, 2005). Así. para muchas especies de importancia económica la multiplicación vegetativa de árboles adultos, o bien presenta serias dificultades o es virtualmente imposible. Como ocurre en las especies frutales y en la mayoría de las especies maderables. Por ello los programas de mejora forestal se encuentran con el gran problema de tener que seleccionar los caracteres de interés en la madurez, mientras que la propagación vegetativa de los mismos es sólo posible durante la fase juvenil de desarrollo. Por esta razón es necesario inducir un grado de rejuvenecimiento en el material vegetal maduro (Quraishi *et al.*, 1997).

1.5 Uso de injertación y microinjertación para el rejuvenecimiento vegetal

El rejuvenecimiento en especies forestales consiste en inducir un proceso inverso a la maduración que implique una reprogramación celular, desdiferenciación y revigorización de tejidos maduros con el fin de lograr en los propágulos derivados de tejidos maduros; un periodo de crecimiento rápido, equiparable al que caracteriza la fase juvenil en plántulas procedentes de semilla (Quraishi *et al.*, 1997). En condiciones *in vitro* se pueden destacar las técnicas de subcultivo seriado, microinjerto, cultivo de

meristemos, cultivo de yemas adventicias y embriogénesis somática para lograr este fin (Fraga *et al.*, 2002; Zapata, 2002).

El microinjerto permite el rejuvenecimiento del material vegetal ontogénicamente adulto sobre portainjertos juveniles, que se corresponde con detección de patrones proteicos característicos de individuos juveniles (Zapata, 2002). Además, tiene la capacidad potencial para inducir reversión de características fenotípicas del estado adulto a estados juveniles haciendo posible la recuperación de explantes funcionales, lo que facilita la manipulación de sus capacidades morfogénicas y, por lo tanto, la propagación de materiales adultos seleccionados (Huang, 1992; Fraga *et al.*, 2002).

Se ha encontrado que la reactivación del material adulto inducida por el efecto de portainjertos juveniles no es una respuesta transitoria, sino que continúa expresándose después de que este material es separado del microinjerto y establecido en medios de cultivo. La adaptación y la capacidad de proliferación son manifestaciones evidentes de la recuperación de características juveniles. En *Pinus nigra*, la revigorización es posible mediante el microinjerto monofásico de braquiblastos y ápices meristemáticos (Fraga *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2005).

1.6 Antecedentes del cultivo *in vitro* de cedro rojo

Actualmente el cultivo *in vitro* se ha constituido en una vía factible para incrementar la propagación de especies leñosas, especialmente las de interés agroforestal, esta técnica permite propagar árboles élites para su futura utilización en plantaciones comerciales, fijando de esta forma su genotipo (Thorpe, 1991).

Los primeros trabajos de cultivo de tejidos en cedro rojo fueron iniciados en 1989 por Ishii y Maruyama, quienes usando ápices lograron obtener plántulas a través de la micropropagación. Pero no fue sino hasta 1997 cuando se publicó la obtención de semilla artificial en cedro rojo encapsulando los ápices obtenidos por micropropagación. En este trabajo se afirma que la embriogénesis somática es la técnica apropiada para la rápida micropropagación a gran escala y para la tecnología de semilla artificial, esta técnica puede ser usada en muchas especies, en la que la embriogénesis somática no ha sido producida, incluyendo al cedro rojo dentro de ese grupo (Maruyama *et al.*, 1997).

En cedro rojo se han realizado trabajos de cultivo *in vitro* utilizando diferentes tipos de explantes desde cotiledones, hipocótilos, epicótilos hasta segmentos nodales, hojas y raíces. Muñoz y colaboradores (2003) desarrollaron una metodología de regeneración de cedro rojo utilizando nudos, entrenudos cotiledones y hojas para inducir la embriogénesis. El medio de cultivo empleado fue el MS adicionado con 20 ml L^{-1} de endospermo líquido de coco generando una tasa de multiplicación de 4 brotes por nudo en un intervalo de 5 meses.

Más recientemente otros autores reportan la propagación de cedro rojo vía organogénesis y embriogénesis, utilizando como explantes hipocotilos, epicótilos, cotiledones, hojas y raíces para la inducción de masas callosas y brotes en un medio de cultivo WPM, resultando favorable la formación de masas callosas pro embriogénicas, raíces en explantes de cotiledones y formación de brotes en explantes de hipocótilos (González-Rodríguez y Peña-Ramírez, 2007).

Para dar seguimiento al trabajo anterior, el autor de este trabajo, (Juárez-Gómez, 2005), experimentó el efecto de la auxina dicamba sobre la formación de brotes en diferentes explantes de cedro rojo (hipocótilos, epicótilos, segmentos nodales y hojas) los cuales fueron incubados en un medio de cultivo WPM a pH 7.5 y dicamba 13.54 µM, carbón activado 1 mg L^{-1} y 20 ml L^{-1} de endospermo líquido de coco, obteniendo resultados de 2.5 brotes por explante de hipocotilo, y 2 brotes por segmento nodal.

Recientemente en nuestro grupo se han establecido protocolos para la propagación *in vitro* de cedro rojo mediante organogénesis y embriogenesis somática, empleando sistemas de inmersión temporal. Sin embargo en estos trabajos se ha utilizado semilla como explante inicial lo cual no garantiza que la nueva progenie erede las características seleccionadas de la planta madre. Todo ello hace necesario el establecimiento de protocolos que permitan la propagación clonal de individuos seleccionados de cedro rojo.

1.7 Justificación

Como ya se ha mencionado, *C. odorata* es una especie de gran importancia ecológica para la restauración de suelos en el neotrópico y económica a nivel mundial gracias a las propiedades mecánicas de su madera. Sin embargo esto último ha propiciado una sobre explotación en su hábitat natural ocasionando con ello un grave problema de erosión genética aunado a los pocos avances sobre su estudio de mejoramiento genético lo cual conlleva a la falta de material propagativo de alta calidad que garanticen el establecimiento de plantaciones comerciales altamente rentables.

Ante este contexto el presente trabajo propone la clonación de árboles genéticamente superiores élite mediante técnicas del cultivo de tejidos vegetales; sin embargo para que esto pueda ser posible es necesario la reactivación de los mecanismos juveniles de los explantes provenientes de árboles adultos, lo cual se puede lograr induciendo el rejuvenecimiento mediante una microinjertación o injertación, para posteriormente micropropagar el material rejuvenecido.

1.8 Hipótesis

La propagación vegetativa de especies leñosas disminuye a medida que se avanza en el cambio de fase, de juvenil a adulto. No obstante, la injertación y microinjertación *in vitro* del material adulto sobre portainjertos juveniles puede ser una vía para revertir este cambio de fase y permitir la propagación clonal de individuos adultos seleccionados.

1.9 OBJETIVOS

1.9.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer un protocolo para el rejuvenecimiento mediante injertación y microinjertación de árboles é lites de cedro rojo (*Cedrela odorata* L).

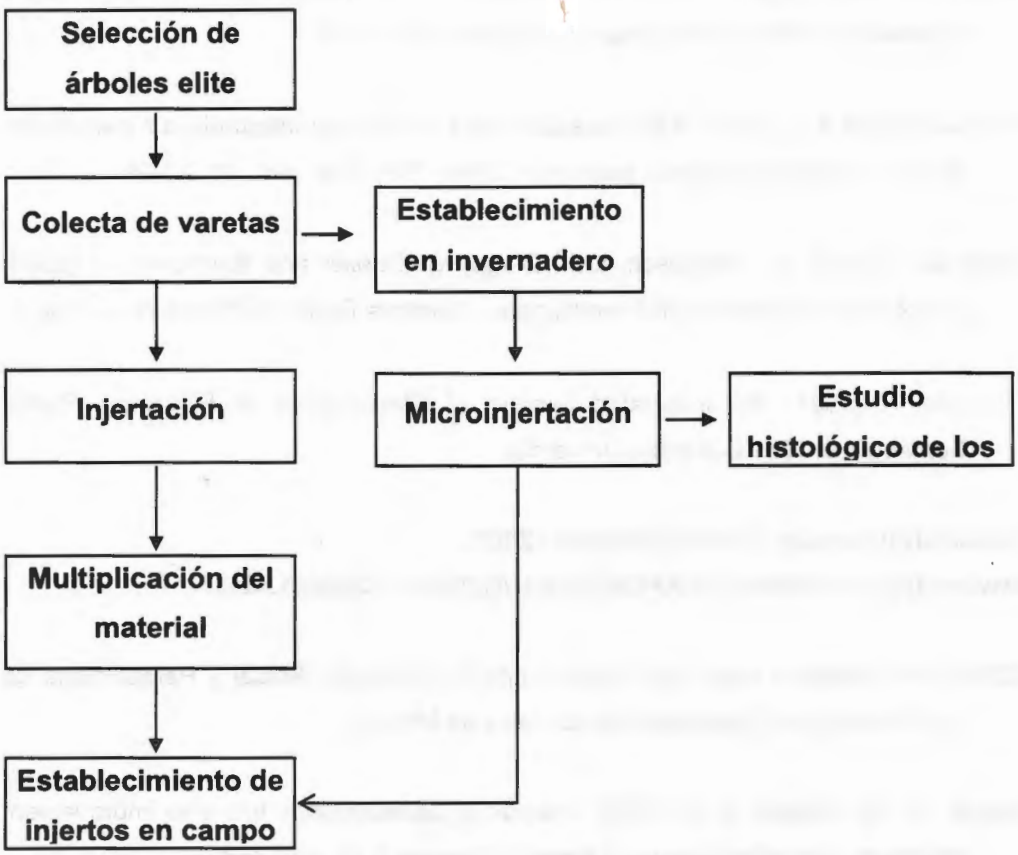
1.9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer condiciones para la Selección de árboles de cedro rojo en campo.

Evaluar el efecto de diferentes sustratos para el enraizamiento y la obtención de brotes en varetas de cedro rojo.

Establecer una metodología para la injertación y microinjertación del material adulto seleccionado.

1.9 Estrategia experimental



1.10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albert, P.D; López, A.A; Rodríguez, T.M y Duarte, R.M (1995). Recursos fitogenéticos forestales, 1. Familia Meliaceae. Fontqueria 42:329-351.

Briceño-Vergara A.J (1997). Aproximación hacia un manejo integrado del barrenador de las meliáceas *Hypsipyla grandella* (Zeller). Rev For. Ven. 41: 23–28.

Cañal, M.J., Fraga, M., Berdasco, L.B., Diego, M. Esteller and Rodríguez, R (2003) Epigenetics, the role of DNA methylation. Currents Topics in Plant Biology Vol. 4.

.

Cronquist, A (1981). An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Copyrirght © 1981 Columbia University

CONAFOR (Comisión Nacional Forestal) (2007). www.conacyt.mx/fondos/CONAFOR/200401/CONAFOR200401.html.

CONAFOR (Comisión Nacional Forestal) (2007). Situación Actual y Perspectivas de las Plantaciones Forestales Comerciales en México.

Cheliak, W. M., Rogers, D. L (1990). Integrating biotechnology into tree improvement programs. Canadian Journal of Forestry Research 20: 452-463.

Duchefa (2001). Biochemicals Plant Cell and Tissue Culture. Duchefa Biochemie BV. Haarlem, the Netherlands.Pa 156.

Eeswara, J., Stuchbury, T., Allan, E and Mordue, A (1997). A standard procedure for the micropropagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). Plant Cell Repts . 17: 215- 219.

FUMIAF-SAGARPA (2005). Fundación Mexicana para la investigación agropecuaria y forestal, Plan de negocios. Cultivo de la especie forestal comercial Cedro Rojo (*Cederla odorata* L.) en México.

Fraga, M., Cañal, M., Aragonés, A and Rodríguez, R (2002). Factors involved in Pinus radiata D. Don. micrografting. *Ann. For. Sci. 59*: 51-157.

George, E.F. and Sherrington, P.D (1984). Plant Propagation by Tissue Culture: Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics. Eversley, Basingstoke, England. 39 p.

Gonzalez–Rodríguez, J.A and Peña–Ramírez, Y.J (2007). Establishment of efficient protocols for massive propagation of tropical trees from Mesoamerica through somatic embryogenesis: Cedrela odorata, Swietenia macrophylla, Cybistax donell–smithii, Crescentia cujete and Cordia dodecandra. In: Proc 2nd IS Acclim Establish. Microprop Plants. Acta Hortic 748:229–234

Giri, C.C., Shyamkumar, B and Anjaneyulu, C (2004). Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. Trees 18: 115–135.

Huang, L.C., Hsiao, C.K., Lee, S.H., Huang, B.L and Murashige, T (1992). Restoration of vigor and rooting competence in stem tissues of mature Citrus by repeated grafting of their shoot apices onto freshly germinated seedlings in vitro. *In vitro* Cell. Dev. Biol. 28: 30-32.

IUCN (2004). Americas Regional Workshop on Conservation and sustainable management of trees (*Cedrela odorata*) In IUCN Red list of threatened species. http://www.redlist.org.

ITTO (2002). International Tropical Timber Organization guidelines for the restoration, management and rehabilitation of degraded and secondary tropical forests, ITTO Policy Development Series No 13. ITTO, Yokohama.

Jeffrey, F. D., Peter, R., La Fayette., Karl-Erik, L., Eriksson, Z., Scott, A and Merkle, D.B (1997). Forest Tree Biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology, 57

Juárez-Gómez, J. (2005). Establecimiento de un medio de cultivo definido para la organogénesis a partir de segmentos de tallos de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.). Residencia profesional. UNIVBE-ITSA, Acayucan, Ver. México.

Keay R, W. J (1996).The future of the genus Swietenia in its native forest. Bot. J. Linn. Soc. 122: 3–7.

Lamb, A.F.A (1968). Fast growing timbers of the lowland tropics, no. 2 *Cedrela odorata* L. Commonwealth Forestry Institute, University of Oxford, Oxford.

Lloyd, G.B., McCown B.H (1981). Commercially–feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. Int. Plant Prop. Soc. Proc. 30: 421–427.

Maruyama, E., Ishii, K., Shigenaga, K and Saito, A (1997). Alginate encapsulated technology for the propagation of the tropical forest trees: (*Cedrela odorata*. L). Guzuma crinita mart. And Jacaranda momosaefolia D. Don. silvae genética, 46(1): 17-23.

Mascareñas, A.F., Kendurkar, S.V., Khuspe, S.S (1993). Micropropagation of teak in Ahuja, MR (Ed) Micropropagation of woody plants. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. 247-258.

Muñoz, S (2003). Embriogénesis somática en cedro (*Cedrela odorata*. L) a partir de cotiledones. Tesis de licenciatura. CIRGEBV, Lima, Perú.

Murashige, T., Skoog, F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15. 53-58.

Navarro, C., Ward, S and Hernandez, M (2002). The tree *Cedrela odorata* (Meliaceae): a morphologically subdivided species in Costa Rica. *Revista Biologia Tropical*, 50, 21–29.

Newton, AC., Baker, P., Ramnarine, S., Mesén, F y Leakey, R.R.B (1993). Mahogany shoot borer: prospects for control. Forest Ecology and Management. Pág. 114-126.

Ostry, M.E., Michler, C.H (1993). Use of biotechnology for tree improvement in *Populus* model systems. In Ahuja, MR. (Ed). Micropropagation of woody plants. Kluwer Academic Publisher. Netherlnds. 471-483.

O'Neil G.A., Dawson I., Sotelo-Montes, C., Guarino, L., Guari-Guata, M., Current, D., Weber, J. C (2001). Strategies for genetic conservation of trees in the Peruvian Amazon. Biodivers. Conserv. 10: 837–850;

Patiño, V.F (1997) Genetic resources of *Swietenia macrophylla* and *Cedrela odorata* in the neotropics: Priorities for coordinates actions. Forest Gnenetics No. 25 FAO, Roma. 12 pp.

Pennington, D. and Sarukhán, J (1968). Árboles Tropicales de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. México, D.F. 413 pp.

Pennington, T. D., Styles, B.T and Taylor, D.A.H (1981). *A Monograph of the Neotropical Meliaceae*. New York Botanical Gardens, New York.

Peña-Ramírez, Y.J., Juárez-Gómez, J., Gómez-López, L., Jerónimo-Pérez, J.L., García-Sheseña, I., González-Rodríguez, J.A and Robert, M.L (2010). Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (Cedrela odorata L.) cultured in vitro using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species. In Vitro Cell. 46:149–160

Rout, G.R (2005) In vitro somatic embryogenesis in callus cultures of Azadirachta indica A. Juss.—a multipurpose tree. J For Res 10:263–267

Quraishi, A., Koche, V., and Mishra, S.K (1997). Micropropagatión of Lagerstroemia parviflora Through axilary bud culture. Silvae Genetic 46(4): 242-245.

Razin y Cedar. (1991). DNA methylation and gene expresión. Microbiol. Rev. 55: 451-458.

Robert, M.L., Herrera-Herrera, J.L., Herrera-Herrera, G., Herrera-Alamillo, M.A., Fuentes-Carrillo, P.A. New temporary bioreactor immersion system for micropropagation. In: Loyola-Vargas V. M.; Vázquez-Flota F. A. (eds) Plant cell culture protocols. Humana, New York, pp 121–399; 2006b.

Rodríguez, R., Diego, L.B., Berdasco, M., Hasbun, R., Valledor, L and Cañal, M.J (2005). Aging, Maturation and Reinvigoration in Agroforestry Species. Forest Biotechnology in Latin America.

Salas, E. J. B (1993). Árboles de Nicaragua. Instituto Nicaragüense de Recursos Naturales y del Ambiente (IRENA). Managua. Nicaragua. 390 p.

Salisbury F., Ross C (2000) *Fisiología de las Plantas*. Paraninfo. Madrid, España. 985 p.

Smith, M. K y Drew, R.A (1990). Current Aplications of Tissue Culture in Plant Propagation and Improvement. Aust. J. Plant Physiol 17:267-89.

Thorpe, T. (1991). Introducción al Cultivo de Tejidos y Biotecnología Vegetal. Resúmenes del curso Técnicas y Aplicaciones de Biotecnología en Especies Forestales. (Ed) Villegas Leopoldo. Corporación Andina de Fomento. Caracas. Venezuela. 91 – 107.

Vargas-Hernandez, J and Adams, W.S (1992). Age-age correlations and early selection for wood density in young Douglas-fir. Forest Science 38:467-478.

Vengadeson, G., Ganopathi, A., Amutha, S and Selvaroj, N (2002). Plant Science. 163 (4): 663-671.

Villalobos, V.M and Torpe, T.A (1991). Micropropagation: conceptos, metodología y Resultados. In Roca, WM; Mroginski LA. (Eds). Cultivo de Tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p. 127-141.

White, T.L (1987). A conceptual framework for tree improvement programs. New Forest 4:325-342.

Zobel, B.J and Talbert, J (1984). Applied Forest Tree Improvement. John Wiley and Sons, New York, NY.

Zapata, J. 2002 *Caracterización Morfológica de la Micropropagación en* Pinus radiata *D. Don.* Tesis. Universidad de Concepción. Chile. 160 pp.

CAPÍTULO II

SELECCIÓN DE ÁRBOLES ÉLITE DE CEDRO ROJO, COLECTA DE MATERIAL VEGETAL Y ESTABLECIMIENTO BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO

2.1 Introducción

La mayoría de los programas de mejoramiento genético en los trópicos se ha basado en la evaluación de especies y procedencias, seguida por el establecimiento de ensayos de progenies y huertos semilleros con los mejores individuos. Sin embargo, actualmente se reconoce que la propagación vegetativa y la selección clonal ofrecen los medios para lograr mayores ganancias genéticas en el menor tiempo posible (Zobel, 1992)

Para lograr lo mencionado anteriormente, el buen inicio de un programa de mejoramiento genético generalmente se debe basar en la selección de aquellos individuos que presentan características fenotípicas deseables en una población determinada (Ipinza, 1998). En este sentido la silvicultura clonal se sostiene en la selección adecuada de árboles sobresalientes para las características que se desea mejorar y en su capacidad para su propagación por métodos vegetativos para obtener copias genéticas idénticas de cada uno, y que ambos aspectos puedan ser utilizados en programas de plantaciones comerciales. Su uso permite la obtención de ganancias genéticas extraordinarias en periodos muy cortos, sin embargo, para optimizar las ganancias genéticas, se debe prestar cuidado especial a la selección de los árboles. (Weng *et al.*, 2010)

Para una especie maderable de importancia económica, un árbol sobresaliente con características deseables, será aquel dominante o codominante, de fuste recto, sin bifurcaciones ni torceduras en espiral, de ramas delgadas y horizontales, libre de enfermedades y plagas. (Zobel & Talbert 1988).

Otro aspecto importante a considerar es el manejo del material vegetal. Una vez que se tengan seleccionados los árboles de interes es recomendable colectar las varetas de brotes ortotrópicos, sanos y vigorosos en las primeras horas de la mañana o de la

tarde, evitando las horas más calientes del día y tomar las medidas necesarias para mantener la turgencia del material, como colocarlas en un recipiente con agua.

Si se van a transportar por distancias largas, es conveniente colocarlos en recipientes que permitan mantener una alta humedad a fin de evitar su deshidratación, uno de los factores críticos a lo largo de todo el periodo de propagación es el mantenimiento de la turgencia del material (Mesén. F, 1997)

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Descripción del área de muestreo

El muestreo se realizó en una parcela de aproximadamente 10 hetáreas en la cual a ún es posible localizar árboles con más de 30 años de edad. Esta parcela se encuentra ubicada en la localidad de Comejen municipio de Acayucan, Veracruz (18° 02' 35.97" N; 94° 51' 16.44" W). El clima que impera en esta región es cálido-húmedo, con una temperatura media anual de 25 °C, lluvias abundantes en verano y a principios del otoño; la precipitación promedio anual es de 1,107 mm. El suelo es regular del tipo luvisol y vertisol, el primero se caracteriza por la acumulación de arcilla y el segundo es duro y presenta grietas (INEGI, 2009).

Figura 3. Ubicación del area de muestreo en el estado de Veracruz . El círculo rojo indica el area de muestreo la cual se localiza en el municipio de Acayucan.

2.3 Selección de árboles de cedro rojo

Para determinar los individuos candidatos a ser seleccionados, primero se realizó una evaluación visual considerando principalmente los caracteres más importantes desde el punto de vista económico (altura, rectitud y diametro del fuste) (Zobel, 1992). Para ello se recorrió caminando la zona de muestreo, marcando con círculos de color naranja el fuste de cinco árboles preseleccionados. Posteriormente se empleó el método de selección por comparación con testigos (Ipinza, 1998). Este método consiste en el cotejo del árbol candidato con los respectivos árboles vecinos (árboles testigo) con respecto a las características de interés. Para este caso, la comparación se efectuó con respecto a los árboles más cercanos en un radio de 50 metros utilizando el árbol candidato como centro (Figura 4). La altura total de cada árbol se midió con un clinómetro a partir de una distacia conocida. El diámetro se midió a la altura del pecho (1.30 m) con cinta métrica.

2.4 Colecta y transporte de varetas

Se programaron colectas de varetas una vez cada dos meses en la época del año en que las yemas permanecen latentes (septiembre-abril). Estas colectas se efectuaron preferentemente en las primeras horas de la mañana a fin de evitar lo menos posible el estresar el material vegetal, de acuerdo a lo recomendado por (Leaykey *et al.*, 1991).

Para obtener las varetas fue necesario que una persona experta en escalar árboles subiera hasta la copa de los mismos a una altura aproximada de 15 m y cosechara porciones de ramas de las cuales se obtuvieron varetas de aproximadamente 50 cm de largo con yemas latentes. Inmediatamente despues se les extrajeron las hojas evitando dañar las yemas (Figura 5b y 5c). Una vez cortadas las varetas fueron colocadas en un recipiente con agua hasta ser empacadas a fin de evitar la pérdida de humedad y reducir el proceso de deterioro fisiológico del material vegetal (Figura 5d). El transporte de las varetas se realizó vía terrestre hasta los invernaderos del Centro de Investigación Científica de Yucatan para ello las varetas fueron reducidas a un tamaño de aproximadamente 30 cm y colocadas en cajas de poliestireno con periódico humedecido y sellada herméticamente con la finalidad de evitar algún daño mecánico (Figura 5e).

Cabe mencionar que para el transporte del material vegetal desde la zona de muestreo en el municipio de Acayucan, Veracruz hasta la ciudad de Mérida, Yucatán fue necesario portar un permiso de la Dirección General de Vida Silvestre adjunta a la Secretaria de Medioambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (anexo 1) debido a que recientemente esta especie fue incluida en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) bajo la categoría de: sujeta a protección especial (Pr) y por tanto se prioriza su recuperación y conservación.

2.5 Establecimiento de varetas bajo condiciones de invernadero para el enraizamiento y la obtención de brotes.

Para inducir el proceso de brotación de yemas latentes y la emisión de raices se utilizaron ambientes controlados de alta humedad tal como lo recomienda (Toribio *et al.,* 2004) para la aclimatación de estacas de *Quercus robur* L. En este dispositivo se evaluó el efecto de diferentes tipos de sustratos y polvos enraizadores, sobre el número de brotes y raíces emitidos por vareta.

Una vez que las varetas estaban en el invernadero, estas limpiaron y despojaron de pequeñas ramas y hojas, tratándose posteriormente con fungicidas [1 g L^{-1} de Captosán® (8% carbendazim y 40% Captán® (p/p)) y 1 g L^{-1} de Benoagrex® (50% (p/p) benomilo)], sumergiéndolas en esta solución durante 10 minutos. Posteriormente fueron establecidas en los seis diferentes tratamientos tal como se muestra en la tabla 3; para cada tratamiento se emplearon 20 varetas a un tamaño aproximado de 30 cm de largo y de 1 a 1.5 cm de grosor las cuales contenian en promedio cinco yemas latentes.

En los tratamientos 1 y 2 se utilizaron contenedores tipo atyroblock con cavidades de 100 centimetros cuvicos a las cuales se les adaptó en la parte superior una malla de metal en forma de túnel y forrado con plástico transparente. Esto para conservar una atmósfera húmeda evitando de esta manera la deshidratación de las varetas, (Figura 6c). El sustrato consistió en una mezcla de esfágnum canadiense comercial (Peat moss) y agrolita en una proporción de 2:1 (p/p), para el tratamiento 1 las varetas fueron depositadas sin enraizador en el tratamiento 2 y 3 las varetas fueron impregnadas en la base a una altura de aproximadamente 2 cm de polvos enraizador Radic 10,000 y Raizone plus respectivamente tal como lo indica la ficha técnica. Cabe señalar que estos productos son ampliamente recomendados para el enraizamiento de especies leñosas.

En los tratamientos 4, 5, 6 donde se utilizó agua purificada como sustrato, el contenedor consistió en cajas tipo Magenta con 250 ml de agua adicionada con los enraizadores antes mencionados a una concentración de 1 g L^{-1}. (para los casos de los tratamientos 5 y 6). Los tratamientos con sustrato sólido fueron regados con agua potable cada tercer día, mientras que en los tratamientos con solución acuosa esta fue cambiada a diario. Después de la emisión de brotes, estos fueron rociados semanalmente con la mezcla antifúngica descrita (Figura 6).

A las cuatro semanas se evaluó el número de varetas con emisión de raices y brotes

Tabla 3. Diferentes tratamientos para la emisión de brotes y raiz en varetas

Sustrato	Tratamiento	N.de varetas	N.de yemas
Peat moss / agrolita	1	20	100
Peat moss / agrolita + Radic 10 000	2	20	100
Peat moss/agrolita + Raizone	3	20	100
Agua purificada	4	20	100
Agua purificada + Radic 10 000	5	20	100
Agua purificada + Raizone	6	20	100

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Selección de árboles élite

Se considera que *C. odorata* es una especie forestal de madera preciosa que a lo largo de los últimos años ha sido selectivo su aprovechamiento sobre los mejores individuos desde el punto de vista comercial (Cavers *et al.* 2004), es de esperarse que al buscar árboles en campo que presenten caracteristicas tipo élite, encontremos casi una nula presencia de los mismos y los pocos que a un quedan en pie, están bajo amenaza de ser talados. Esta situación fue constatada cuando se colectó el material necesario para este trabajo, donde en un área de aproximadamente 10 hectáreas fueron localizados únicamente cuatro árboles con caracteristicas de interés y cuyos datos son mostrados en la tabla 4, de acuerdo al propietario de la parcela el Sr. Pablo Juárez Silva, éstos árboles nacieron y crecieron de manera silvestre y cuentan con una edad aproximada de 20 a 30 años.

Tabla 4. Descripción de los árboles seleccionados en la localidad de Comején municipio de Acayucan Veracruz.

Árbol	Edad aproximada (años)	Altura (Mts)
1	30	20
2	25	23
3	28	30
4	30	22

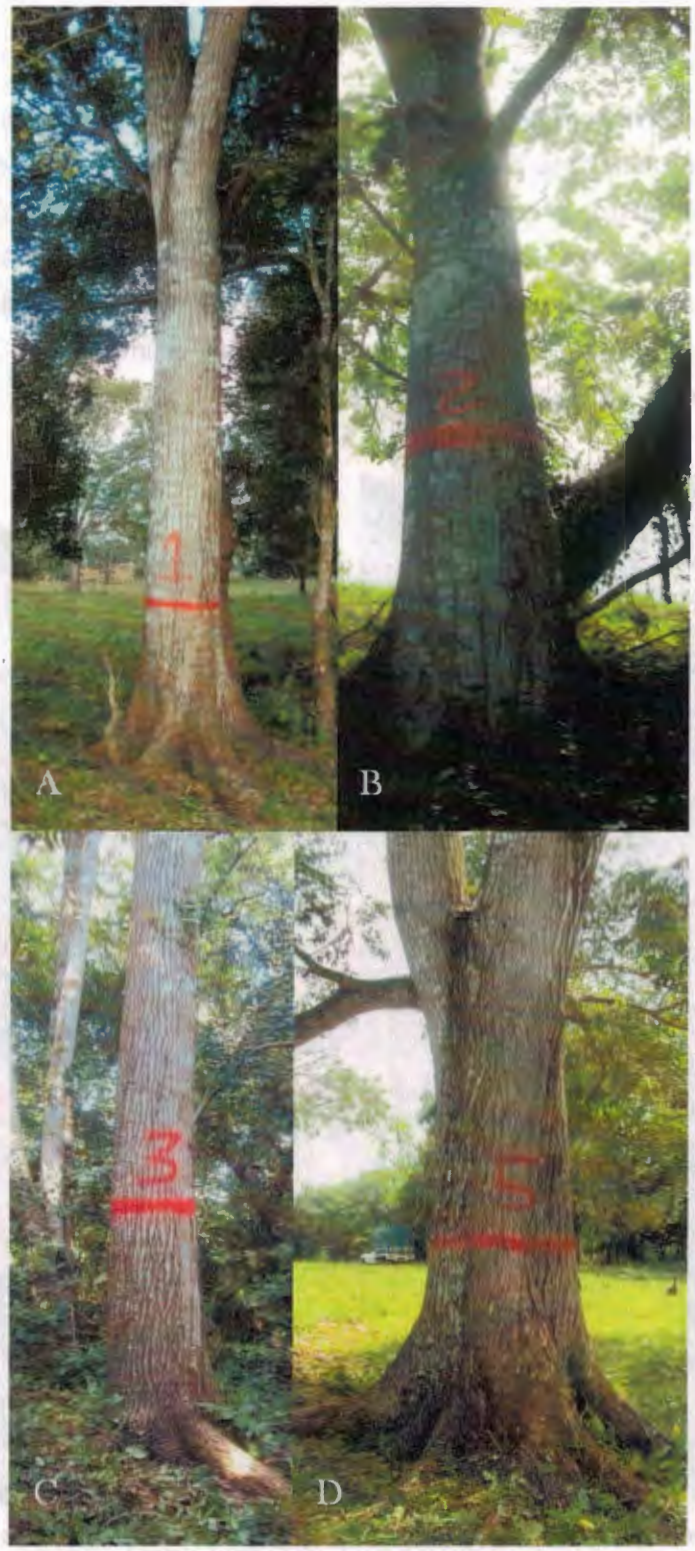


Figura 4. Árboles seleccionados de cedro rojo. Ubicados en la localidad de Comejen municipio de Acayucan Veracruz (18° 02' 35.97" N; 94° 51' 16.44" W).

2.3.2 Colecta y transporte de varetas

De cada viaje de colecta se obtuvieron aproximadamente 300 varetas, mismas, que fueron bajadas de la copa de cada árbol mediante el método de escalado, el cual resultó eficiente debido a que al desprender una rama completa del árbolno sufrian daño mecánico y se podian obtener alrededor de 100 varetas. El método adaptado de almacenamiento en cajas de poliestireno con alta humedad y sellado hermético resultó eficiente debido a que las varetas llegaban al invernadero del CICY sin aparente deterioro fisiológicos ni daños mecánicos.

Figura 5. Colecta de varetas. A) escalamiento a la copa del árbol, b) corte de ramas, c) obtención de varetas, d) varetas en agua, e) almacenamiento de varetas en caja de poliestireno para su transportación.

3.2.3 Emisión de brotes y raíces en varetas establecidas bajo condiciones de invernadero

Una vez obtenidas las varetas y llevadas al invernadero, estas se mantuvieron bajo las condiciones descritas en el apartado de metodologia y después de dos semanas en estas condiciones se observó que las varetas presentaban emisión de brotes a través de las yemas latentes (Figura 6). La tabla 5 muestra los porcentajes de brotes en los diferentes tipos de sustratos y se puede observar que los tratamientos que mejor respondieron fueron los consistentes en sustrato líquido marcando una clara diferencia respecto a los sustratos solidos. Los brotes obtenidos en sustrato líquido continuaron su desarrollo alcanzando a las seis semanas un tamaño aproximado de 3 cm; los que permanecieron vivos hasta por cuatro meses (Figura 6b). Estos resultados coinciden con los obtenidos por (Benedetti *et al.,* 2006) durante la inducción de yemas de *Castanea sativa* en sustrato líquido. Es probable que las varetas al estar contenidas en un sustrato líquido conserven una turgencia más elevada respecto a las establecidas en sustrato sólido, lo que les permite el flujo constante de líquidos desde la base hasta el extremo apical favoreciendo con ello la emisión de las yemas y la supervivencia de los brotes por periodos relativamente largos (Figura 7),

Tabla 5: Porcentajes de emisión de brotes en varetas establecidas bajo diferentes sustratos

Sustrato	Tratamiento	N.de yemas	% de yemas que produjeron brotes
Peat moss/agrolita	1	100	34
Peat moss/agrolita + Radic 10 000	2	100	34
Peat moss/agrolita + Raizone	3	100	36
Agua	4	100	96
Agua + Radic 10 000	5	100	95
Agua + Raizone	6	100	96

En cuanto a los tratamientos consistentes en sustrato sólido (tratamientos 1, 2 y 3) el promedio de brotes por vareta fue de uno iniciando la emisión de estos a las cuatro semanas. A las seis semanas tenian en promedio un tamaño de 2 cm, y a la octava semana presentaban defoliación progresiva hasta finalmente morir. (figura 6,c). Cave señalar que no se obtuvo enraizamiento de las varetas en ninguno de los tratamientos

adicionados con los enraizadores (Radic 10 000 y Raizone plus) (figura 6 d). Ante este contexto se ha señalado que el éxito de la propagación vegetativa de especies leñosas disminuye a medida que se avanza en el cambio de fase, de juvenil a fase madura (Fraga *et al.*, 2002). Lo cual afecta la capacidad de enraizamiento del material vegetal (Salisbury y Ross 2000; Rodríguez *et al.*, 2005).

Una de las ventajas de poder establecer material seleccionado en condiciones de invernadero, respecto a la recolección directamente del árbol son el suministro controlado de brotes durante un periodo amplio, y mantener un control para permitir una mayor asepsia. Este mismo procedimiento se ha utilizado para la obtención de brotes que posteriormente son utilizados para su propagación por embriogénesis somática en *Quercus robur* L. (Toribio *et al*, 2004).

Figura 6. Varetas con brotes a dos semanas de ser cultivadas bajo condiciones de invernadero en distintos tipos de sustratos y polvos enraizadores. A 1) Varetas contenidas solo en agua purificada, a 2) varetas establecidas en agua purificada y polvos enraizadores (Radic 10 000 y Raizone plus) respectivamente, b) varetas en camara humeda y sustrato sólido, c 1) Vareta establecida solo con sustrato sólido, c 2 y 3) varetas establecida en sustrato soólido más enraizadores (Radic 10 000 y Raizone plus) respectivamente, notese la nula ausencia de raiz en la base de las varetas.

Figura 7. Varetas establecidas en agua potable. A) varetas con brotes a las cuatro meses , B) brote de cuatro centimetros de longitud.

2.4 CONCLUSIONES

- Mediante el método de comparación fueron seleccionados 5 árboles superiores en un predio de 10 hectáreas ubicado en la comunidad de Comején municipio de Acayucan, Veracruz.

- El cuidado de la turgencia y de daños mecánicos en las varetas durante la colecta y el transporte fue indispensable para un eficiente establecimiento de las mismas.

- El establecimiento de varetas en agua resultó ser el mejor método para la obtención de brotes ocurrido a las dos semanas del cultivo y logrando sobrevivir hasta por cuatro meses.

- La emisión de brotes, en varetas colectadas de las copas de los árboles, es un procedimiento ventajoso para la provisión controlada de brotes

2.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Benedetti, S., Paz, M., González, M (2006). Bases para una estrategia de Mejoramiento Genético de Cataño Forestal en Chile, Paper presentado al 3er Congreso Chileno de Ciencias Forestales.

Cavers, S., Navarro, C., Lowe, A.J (2004). Targeting genetic resource conservation in widespread species: a case study of Cedrela odorata L. For Ecol Manage 197:285–294

Fraga, M., Cañal, M., Aragonés, A., Rodríguez, R (2002). Factors involved in Pinus radiata D. Don. micrografting. *Ann. For. Sci. 59*: 51-157.

Ipinza, R.H (1998). Mejoramiento genético forestal: Programa CONIF- Ministerios de agricultura sobre investigaciones en semillas de especies forestales nativas. INSEFOR. Santa Fe de Bogotá, Colombia. Pp: 47 – 84.

INEGI, Instituto Nacional de Estadistica Geografia e Historia (2009). Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, Acayucan, Veracruz de Ignacio de la Llave. Clave geoestadística 30003.

Leakey, R.R.B., Mesén, F (1991). Propagación vegetativa de especies forestales: enraizamiento de estacas suculentas. In manual sobre mejoramiento genético con referencia especial a América Central. (Eds. Cornelius, J, Mesén, F. y Corea, E). CATIE, Turrialba, Costa Rica. Pp 113-133

Mesén, F (1997). Enraizamiento de estacas juveniles de especies forestales: uso de propagadores de sub-irrigación. CATIE. Turrialba, Costa Rica. Pp: 11.

Rodríguez, R., Fernández, M., Pacheco, J., Cañal, M (2005). Envejecimiento Vegetal, una Barrera a la Propagación. Alternativas. En Sánchez- Olate M, y Ríos D (Eds.) *Biotecnología Vegetal en Leñosas de Interés Forestal.* Universidad de Concepción. Chile. pp. 29-49.

Salisbury F., Ross C (2000) *Fisiología de las Plantas*. Paraninfo. Madrid, España. 985 p.

SEMARNAT, Secretarai de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial. México, D.F.

Toribio, M., Fernández, C., Celestino, C., Martínez, M.T., San-José, M.C., Vieitez, A.M. (2004). Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. Plant Cell, Tissue Org. Cult. 76:283-287

Weng, Y.H., Park, Y.S., Krasowski, M.J (2010). Managing genetic gain and diversity in white spruce multi-varietal forestry in New Brunswick. Tree Genet Genom 6:367–376

Zobel, B. (1992). Silvicultural effects on wood properties. IPEF International. Piracicaba, S.P. Brazil. 2: 31-38.

Zobel, B., Talbert, J.T (1988). Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. Editorial Limusa, México Pp 199-244.

CAPÍTULO III

INJERTO Y MICROINJERTO COMO MEDIO PARA REVERTIR CAMBIO DE FASE (juvenil - adulto) EN ÁRBOLES ADULTOS DE CEDRO ROJO (*Cedrela odorata* L.)

3.1 Introducción

La propagación de un árbol para establecimiento de plantación clonal se distingue de la propagación con fines de producción de semilla básicamente porque; en la silvicultura clonal, no interesa la producción de variabilidad fruto de la recombinación genética de ambos parentales, sino generar árboles de crecimiento ortotrópico normal, similares al árbol que les dio origen (Hartmann y Kester's (2002). Para esto, la técnica más utilizada es la del enraizamiento de varetas, utilizando material fisiológicamente juvenil, es decir que provenga de individuos que están en la fase de crecimiento rápido Hartmann y Kester's (2002). Precisamente esta es una de las principales limitaciones prácticas de la silvicultura clonal, ya que la selección de los árboles que se quieren propagar se basa en ciertas características de importancia económica tales como la rectitud del fuste, ramificación, densidad de la madera, entre otras (Celestino *et al.*, 2005), características que son expresadas cuando los árboles llegan a su madurez ontogénica, es decir, cuando alcanzan y mantienen su potencial reproductivo y cesan su crecimiento rápido (McGowran *et al.*, 1998). Es importante destacar que el estado de madurez del árbol está asociado con la perdida de la capacidad de diferenciación, como la facultad de enraizamiento del material vegetal (Salisbury and Ross, 2000).

Es principalmente debido a la pérdida de la capacidad rizogénica del material adulto que el éxito de la propagación vegetativa de especies leñosas disminuye (Fraga *et al.*, 2002b). Sin embargo, algunos autores sugieren que la manipulación de individuos adultos solo es posible después de procesos de revigorización o rejuvenecimiento. Estos procesos son herramientas que buscan revertir el cambio de fase de adulto a juvenil en tejidos maduros, logrando que los tejidos provenientes de árboles de interés en fase reproductiva muestren características fisiológicas similares a las que se manifiestan en tejidos de árboles juveniles o en fase de crecimiento rápido. Los tejidos rejuvenecidos o revigorizados pueden obtenerse por varios métodos, sin embargo el más recurrido es mediante injertación o microinjertación *in vitro* o *ex vitro* de material adulto sobre patrones juveniles, donde la eficacia de estos tratamientos depende de la especie e incluso del clon (Bonga, 1993).

Las técnicas de injerto y microinjerto permiten el rejuvenecimiento de yemas vegetativas ontogénicamente adultas sobre portainjertos juveniles, que se corresponde con detección de patrones proteicos característicos de individuos juveniles (Zapata *et al.*, 2002). Además, tienen la capacidad potencial para inducir reversión de características fenotípicas fisiológicas del estado adulto a estados más juveniles, haciendo posible la recuperación de explantes funcionales o responsivos a partir de tejidos maduros, facilitando así la manipulación de sus capacidades morfogénicas y, por lo tanto, la micropropagación de materiales adultos seleccionados (Huang, 1992; Fraga *et al.*, 2002 a). Durante el rejuvenecimiento es muy probable que se estén alterando secuencias de procesos genéticamente programados que controlan las diferentes fases de desarrollo. Estos procesos de rejuvenecimiento deben permitir la recuperación de características específicas que acompañan al rápido crecimiento vegetativo del estado juvenil, tales como la capacidad de división y proliferación celular y la capacidad rizogénica (Pliego, A. y Murashige, T, 1987).

Aunque existen evidencias macro morfológicas de que es posible inducir la revigorización de ciertos tejidos vegetales, también es cierto que los mecanismos fisiológicos y moleculares implicados en los procesos de envejecimiento y revigorización no se conocen en profundidad (Pierik, 1990; Fraga *et al.*, 2002 b)

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Material vegetal

Para la injertación bajo condiciones de invernadero se utilizaron como porta injertos o patrones, plantas de cedro rojo germinadas de semillas. Estas plantas tenían aproximadamente seis meses de edad y median en promedio 70 cm de altura y 1 cm de diámetro. Los injertos consistieron en varetas de 12 cm de longitud y 1 cm de diámetro con un promedio de cinco yemas axilares latentes. Dichas varetas fueron colectadas de la copa de árboles élite, en los meses de febrero a mayo del 2012 Siguiendo la metodología mencionada en el Capítulo II de este trabajo.

Para el caso de la microinjertación se utilizaron como porta injerto plántulas de *C. odorata* de seis meses de edad originadas de semillas germinadas *in vitro* en medio MS basal (Murashige and Skoog, 1962). De acuerdo a lo recomendado por (Juárez-Gómez. J, 2008). Los injertos consistieron en brotes de 6 semanas de edad que median en promedio 4 cm de longitud obtenidos de varetas de árboles adultos establecidas en agua bajo condiciones de invernadero (descrito en el capítulo II).

3.2.2 Injerto bajo condiciones de invernadero

La injertación de varetas adultas sobre portainjertos juveniles se realizó de acuerdo a la técnica de hendidura plena, debido a que es ampliamente utilizado con éxito para la propagación vegetativa de frutales, la cual consiste en los siguientes pasos:

a) Preparación del portainjerto. Las plantas juveniles de seis meses de edad en crecimiento activo, se decapitaron a una altura de 15 cm de la base; a partir de la superficie de corte se realizo una hendidura longitudinal de igual tamaño al de la cuña del injerto (Figura 8 a y b)
b) Preparación del injerto. De las varetas colectadas de árboles elite de cedro rojo se tomaron porciones de 10 a 12 a cm de longitud con un promedio de cinco yemas latentes. En la porción basal de la vareta se realizaron dos cortes oblicuos convergentes para formar una cuña (Figura 8 c).
c) Unión injerto portainjerto. El injerto con su porción basal en forma de cuña, se insertó en la hendidura del portainjerto (Figura 8 d y e) y la zona de unión injerto-portainjerto se sujetó con ligas de hule y fue sellado con película plástica

autoadherente Kleen Pack® para evitar la deshidratación del tejido expuesto (figura 8 f y g).

El prendimiento y la supervivencia del injerto y portainjerto fueron evaluadas a las dos y cuatro semanas posteriores a la fecha de realizado el injerto.

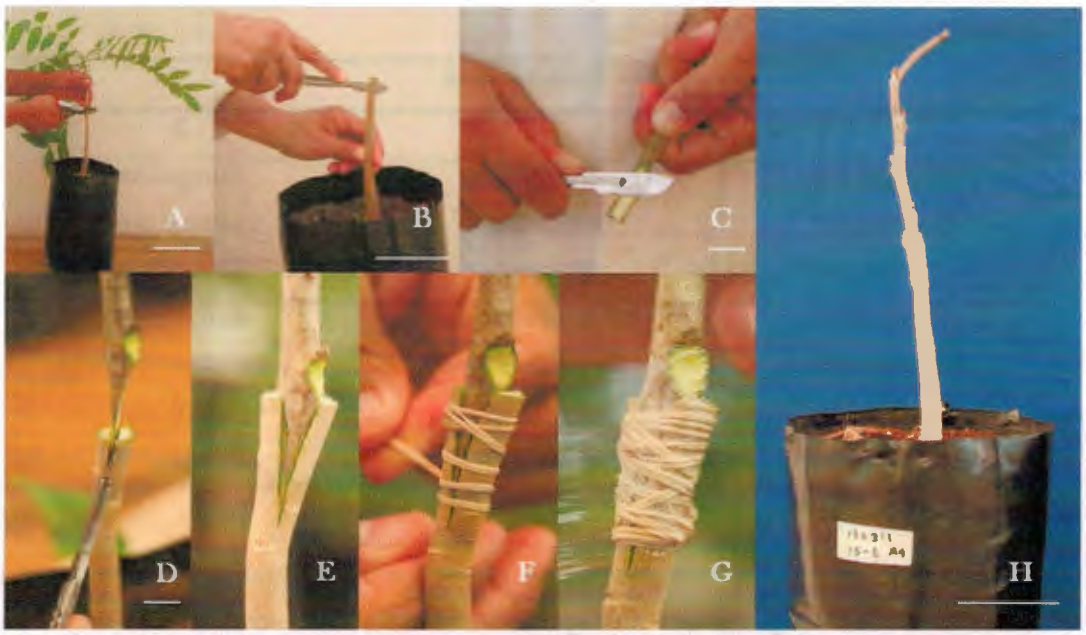


Figura 8: Proceso para la injertación de cedro rojo. a) plantas de seis meses de edad a las cuales seles corta el ápice a una altura de quince centímetros desde la base, b) corte diametral, c) formación de una cuña en la parte inferior del injerto, d y e) unión del injerto con el portainjerto, f) la zona de Injertación es sujetada con ligas de hule, g) sellado de la unión injerto-portainjerto con película plástica, h) aspecto general de un injerto. Escala de barras: (a) 10 cm, (b) 5 cm, (c) 1 cm, (d, e, f y g) 1 cm, (h) 10 cm.

3.2.3 Microinjertación *in vitro*

Preparación de injerto. Brotes de aproximadamente 4 cm fueron colectados de varetas no injertadas establecidas en invernadero (Figura 9 a). Los brotes fueron separados de la vareta cortando la base de los mismos (Figura 9 c). Posteriormente fueron sometidos al siguiente proceso de desinfestación superficial: Primeramente los brotes fueron lavados con agua destilada estéril y Tween® 80 (1 mL $\cdot L^{-1}$) (v/v) agitando durante 10 minutos, pasado este tiempo se enjuagaron con agua destilada estéril hasta retirar los restos del detergente, de inmediato fueron tratados con hipoclorito de calcio ($CaOCl_2$) al 10 % (p/v) durante 10 minutos, seguido de tres enjuagues con agua

destilada estéril. Posteriormente se sometieron a diferentes tratamientos con fungicidas y antibióticos tal como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Tratamientos de antimicrobianos aplicados a brotes de *C. odorata* para la microinjertación. Se muestran los distintos componentes empleados en cada tratamiento (un fungicida y un antibiótico por tratamiento), mismos que fueron aplicados al explante durante los tiempos descritos.

Tratamientos		
1	2	3
Fungicida	**Fungicida**	**Fungicida**
Switch 2 $g \cdot L^{-1}$	Switch 2 $g \cdot L^{-1}$	Switch 2 $g \cdot L^{-1}$
10 minutos	20 minutos	30 minutos
Antibiótico	**Antibiótico**	**Antibiótico**
Bencilpenicilina	Bencilpenicilina	Bencilpenicilina
400 000 $UI \cdot L^{-1}$	400 000 $UI \cdot L^{-1}$	400 000 $UI \cdot L^{-1}$
10 minutos	20 minutos	30 minutos

El material vegetal fue inmerso en el antibiótico inmediatamente después del tratamiento con fungicida sin enjuagarlo. Finalmente los brotes sin enjuagar se colectaron en un vaso de precipitado estéril y fueron preparados para la microinjertación. Todo el procedimiento de desinfestación fue realizado en campana de flujo laminar y manejo aséptico.

Preparación del portainjerto. Los portainjertos consistieron en plántulas *in vitro* de aproximadamente seis meses de edad obtenidos de semilla (Figura 9 d), a los cuales se les eliminaron las yemas y la porción apical dejando un segmento de tallo de aproximadamente 6 cm con raíz (Figura 9 e), posteriormente se realizó un corte medio longitudinal en la parte apical, acorde con el tamaño de la cuña del portainjerto 1 cm (figura 9 f).

Microinjertación. La microinjertación se realizó de acuerdo a la metodología establecida por Murashige *et al.* (1972), donde plantea la posibilidad del microinjerto *in vitro* de ápices sobre plántulas provenientes de semillas. En este caso el injerto fue insertado dentro de la hendidura del portainjerto y la zona de contacto injerto-portainjerto se sujetó con laminillas de aluminio estériles de 5 cm de largo por 1.5 cm de ancho con la ayuda de pinzas de punta doblada (figura 10, d y e). Los microinjertos

fueron establecidos en tubos de ensaye conteniendo 15 mL de medio MS basal, colocados a una temperatura de 24 ± 2°C, bajo una intensidad lumínica de 80 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, fotoperiodo de 16 h luz y una humedad relativa del 60%.

Figura 9: Preparación del injerto y portainjerto para la microinjertación. a) brotes de cuatro semanas de edad, c) separación del brote de la vareta, d b y e) plántulas germinadas *in vitro* de seis meses de edad, f) plántula con corte longitudinal en la parte superior.

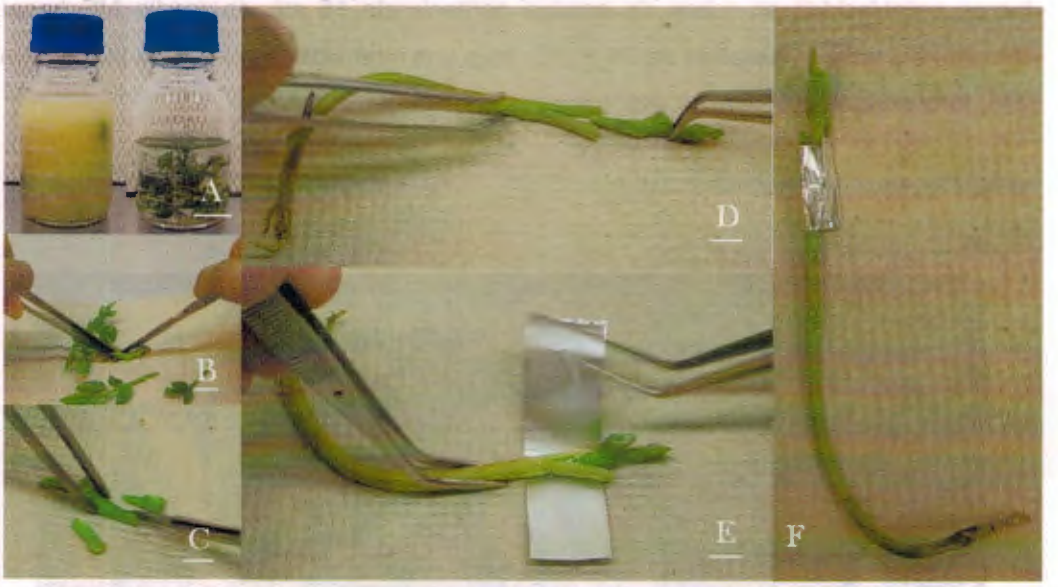


Figura 10: Proceso de la microinjertación. a) desinfestación de los brotes, b) limpieza de los brotes y corte de hojas, c) formación de cuña haciendo un corte en forma de "V", d) unión del injerto con el portainjerto, e) la zona de Injertación es sujetada con una porción de papel aluminio, f) microinjerto. Escala: (a) 3 cm, (b) 10 mm, (c, d, e) 5 mm.

3.2.4 Evaluación del prendimiento y asepsia del cultivo.

El prendimiento es la unión que se produce entre el ápice y el porta injerto. Esta unión define el éxito del injerto. Además, es una prueba de la compatibilidad entre el injerto y el portainjerto. El objetivo de este análisis es determinar el número de plantas microinjertadas e injertadas exitosamente.

Para ello se observó la zona del injertación a fin de determinar anomalías, como decoloración o presencia de necrosis. Además, con una pinza estéril y en la cámara de flujo laminar, se retiró la hoja de aluminio que sujetaba la zona de injertación en los microinjertos. Para evaluar la asepsia del cultivo se hicieron observaciones a los mismos con la finalidad de detectar aquellos que presentaban contaminación bacteriana o fúngica. Estos análisis fueron realizados posteriores a las dos semanas de ser efectuada la microinjertación e injertación.

3.2.5 Análisis histológico de los microinjertos

Para el análisis histológico se adapto la metodología de (Berlín y Miksche, 1976) para lo cual se utilizaron microinjertos de seis semanas posterior a la injertación de los cuales se tomaron muestras seccionando la zona de injertación en cortes longitudinales. Las muestras se fijaron durante 48 h en solución Formol-Acético-Alcohol FAA, compuesta por 10% de formaldehído, 5 % de ácido acético glacial, 50% de etanol y 35 % de agua destilada. Con posterior deshidratación en diferentes concentraciones de etanol (30, 50, 70, 85, 96 y 100 %) antes de ser infiltradas y embebidas en resina de plástico JB-4 de metacrilato de glicol (Polyscience). Se realizaron cortes longitudinales de (7 a 10 micras de espesor) con un micrótomo de rotación HM340E MICROM. Los cortes fueron fijados en portaobjetos y teñidos con azul de toluidina para finalmente incluirlos en solución de Poly-mount (Polysciences). Los estudios y fotografías fueron realizados empleando un microscopio óptico compuesto modelo XXX (Zeiss).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Injerto bajo condiciones de invernadero

Los resultados obtenidos en cuanto al prendimiento es decir la consolidación favorable de los tejidos injertados, a las dos, cuatro y ocho semanas posterior a la injertación son presentados en la tabla 1, los cuales muestran un alto porcentaje de prendimiento alrededor del (95 %) (Figura 11), los cuales muestran un alto porcentaje de prendimiento de alrededor del 93 % (Tabla 6). Como ya se ha mencionado anteriormente, en este mismo documento, las recomendaciones en la literatura sugieren que la mejor época del año para realizar la injertación en climas tropicales va de marzo a mayo, justo antes de que surjan los nuevos brotes. Los resultados aquí mostrados fueron obtenidos en este mismo periodo y es probable que el alto prendimiento de los injertos esté asociado al estado fisiológico de la planta madre y posiblemente a los niveles hormonales endógenos al momento de la colecta del material vegetal, tal como ha sido mencionado en trabajos similares con *Pinus radiata* (Fraga *et al.*, 2002 a) y en *Pinus pinea* por (Cortizo *et al.* 2004).

Tabla 7: Prendimiento a las dos, cuatro y ocho semanas después de la injertación

N. de Injertos	Mes	Prendimiento %		
		2 semanas	4 semanas	8 semanas
20	Febrero	91	91	91
20	Marzo	93	93	93
20	Abril	91	92	92
20	Mayo	92	92	92

Por otro lado, al tratarse de un homoinjerto (es decir, tejido de la misma especie) se esperaba que ambos tejidos resultaran compatibles lo cual resultó cierto. Esto se vio reflejado en una formación callosa en la zona de injertación y un crecimiento vigoroso del injerto, todo ello como consecuencia de un establecimiento rápido de la conexión vascular. La compatibilidad entre dos especies a injertar es un parámetro decisivo cuando se espera el prendimiento del mismo, pues si estas no tienen un parentesco genético, muy difícilmente puede ocurrir una unión y un crecimiento normal del injerto (Joshi *et al.*, 2003). Como lo menciona (Zecca, 1995), la compatibilidad es la capacidad del injerto y el portainjerto para producir una unión exitosa que permite a la nueva planta compuesta, desarrollarse satisfactoriamente.

Se han efectuado numerosos estudios sobre la cicatrización de las uniones en injertos en su mayoría en plantas leñosas (Hartmann y kester´s, 2002). En forma resumida, la secuencia de eventos en la cicatrización de la unión de injertos es como sigue:

El tejido recién cortado del injerto, con capacidad de actividad meristemática, se coloca en contacto con tejido similar recién cortado del portainjerto, de manera que las regiones cambiales de ambos estén en estrecho contacto. Las condiciones de temperatura y humedad deben ser tales que estimulen a actividad de crecimiento en las células recién expuestas y en las circundantes. Las capas externas expuestas de células de la región cambial tanto de la púa como del patrón producen células de parénquima que pronto se entrelazan y entremezclan, formando lo que se llama tejido calloso. Algunas células de este callo de nueva formación que están en la misma dirección de la capa de cambium del injerto y el portainjerto. Se diferencian en nuevas células cambiales. Estas nuevas células cambiales producen nuevo tejido vascular, xilema hacia el interior y floema hacia el exterior, estableciendo así la conexión vascular entre la púa y el patrón, un requisito para el éxito de la unión del injerto. De esta manera, la formación de una unión de injerto puede considerarse como la cicatrización de una herida (Hartmann y kester´s, 2002).

En este sentido, en la Figura 12 se pueden observar injertos de ocho semanas de edad mostrando un crecimiento vigoroso. Este resultado es muy alentador ya que, contar con un protocolo que permita lograr con éxito el establecimiento de fenotipos superiores desde el terreno para posteriormente disponer de suficiente material para la instalación de huertos semilleros clónales, es de gran importancia para cualquier programa de mejoramiento genético.

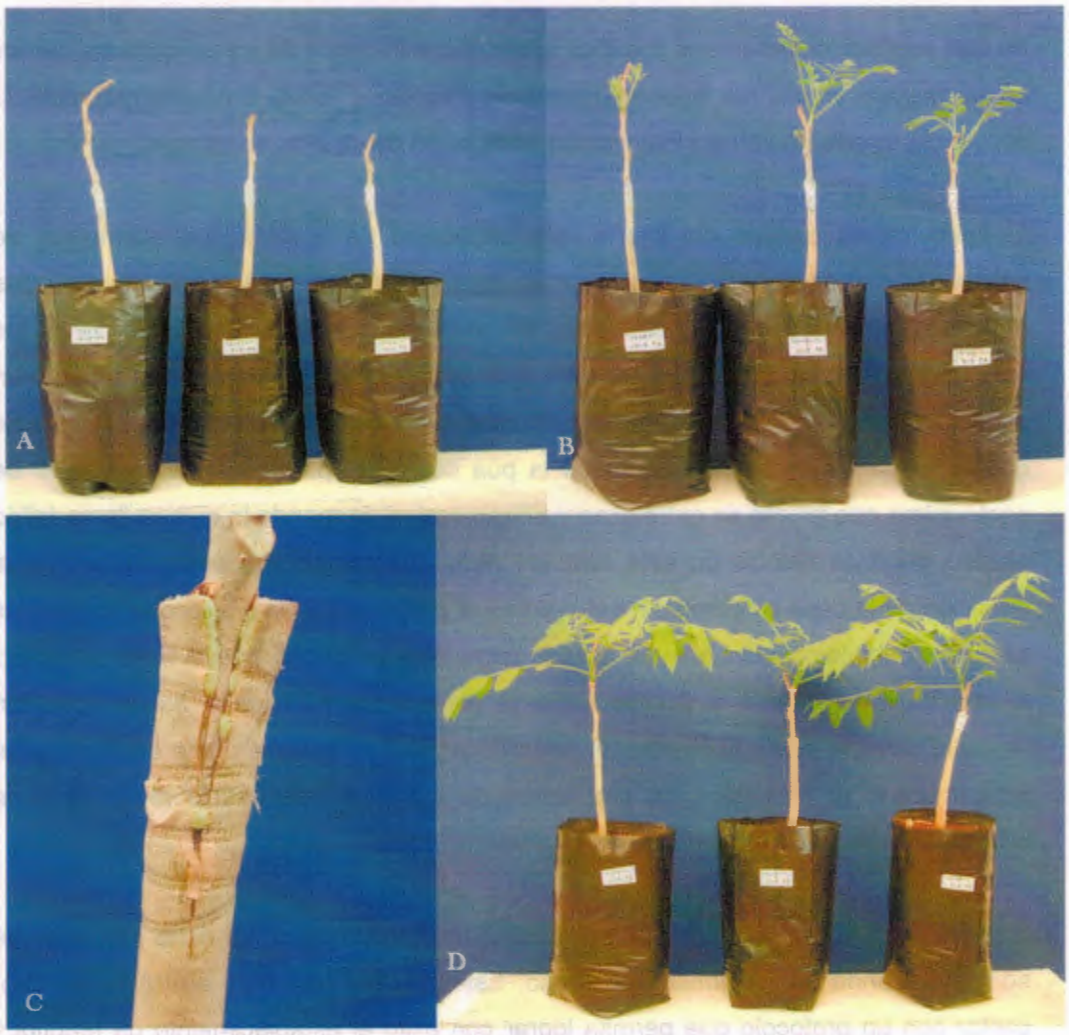


Figura 11: Injertos de cedro rojo. a) inicio de la injertación, b) injertos de dos semanas de edad, c) formación de estructura callosa en la zona de injertación a las dos semanas de iniciado el cultivo, d) injertos de cuatro semanas de edad.

Figura 12: Injertos de ocho semanas de edad.

3.3.3 Material Injertado vs material no injertado

Una de las características observadas en los brotes obtenidos de varetas adultas injertadas sobre patrones juveniles fue el crecimiento vigoroso de estos alcanzando a las ocho semanas un tamaño promedio de 10 cm (Figura 13a),muy por encima del material no injertado (Figura 13b). Esto podría considerarse como una recuperación de caracteres juveniles relacionados con división celular, crecimiento y desarrollo, tal como fue observado por (Siniscalco y Pavolettoni., 1988) en injertos de eucalipto.

Otro aspecto importante a considerar es la incapacidad de floración observada en varetas adultas que fueron injertadas sobre portainjertos juveniles (típica característica de plantas jóvenes) (Figura 13a y b), mientras que en aquellas que no fueron injertadas y que sólo se establecieron en agua bajo condiciones de invernadero, se observó presencia de floración en su totalidad, lo cual coincidió con la época de floración en los árboles adultos de cedro rojo (mayo - junio) (figura 13c y d). Todo ello nos hace pensar que la injertación de material adulto sobre patrones juveniles induce un cierto grado de rejuvenecimiento a dicho material. Otros autores sugieren que la injertación tiene la capacidad potencial para inducir reversión de características fenotípicas del estado adulto a estados juveniles, haciendo posible la recuperación de explantes, lo que facilita la manipulación de sus capacidades morfogénicas y, por lo tanto, la clonación de materiales adultos seleccionados (Huang, 1992; Fraga *et al.*, 2002 b). De acuerdo a diferentes autores Franclet, (1983); Hackett, (1987); y Wendling y Xavier (2001) la propagación vegetativa a través de injerto induce rejuvenecimiento de la porción adulta injertada, evidenciado por la capacidad de proliferación celular que caracteriza el crecimiento vegetativo en la fase juvenil. El hecho de que el material

adulto injertado no presente floración a diferencia del material no injertado que floreció a las nueve semanas nos sugiere que es posible que la injertación este modificando de alguna manera la expresión de ciertos genes implicados con dicha floración, contrario a lo que sucede con el material adulto que no fue injertado y que si presenta floración, en este sentido es necesario realizar estudios moleculares a detalle a fin de corroborar lo antes dicho.

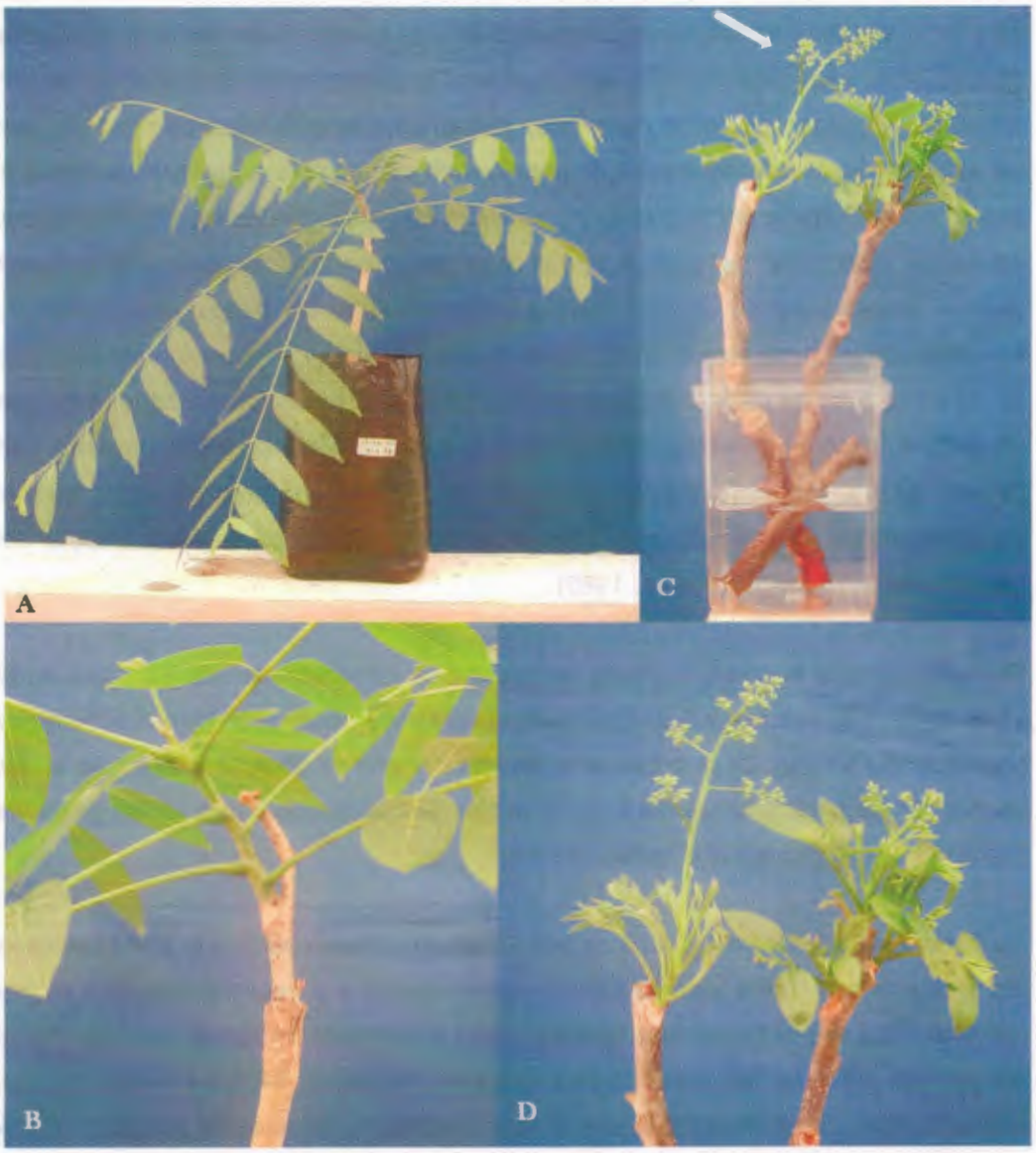


Figura 13: Injerto y varetas de ocho semanas de cultivo. a) Aspecto general de un injerto, b) brote de aproximadamente diez centímetros, c) varetas contenidas solo en agua purificada, la flecha en blanco indica la posición de la inflorescencia, d) acercamiento de los brotes con inflorescencias de varetas en agua.

3.3.4 Microinjertos

Los resultados analizados a las dos semanas de ser realizada la microinjertación de brotes (injerto) sobre plántulas *in vitro* (portainjerto) (Figura 14a), muestran el proceso de prendimiento entre el injerto y portainjerto justo en la zona de injertación (ZI) (Figura 14b) lo cual se evidenció inicialmente mediante la formación de un callo traslucido (Figuras 14c y d). Estos resultados fueron similares al trabajo realizado en uva, donde

Mhatre *et al.* (2007) señalaron el establecimiento de la unión vascular a los doce días posterior a la injertación. Por otro lado Aguilar *et al.* (1990) señala que al injertarse dos especies, las partes afectadas desarrollan inicialmente un callo. Esto quiere decir, que no existen células diferenciadas que permitan un intercambio de nutrientes desde el patrón hacia el ápice. Por lo que es necesario la diferenciación de las células callosas en haces vasculares, tanto en el injerto como en el portainjerto, para que su unión permita la formación de un solo tejido o soldadura entre las partes, que permita, la absorción de los nutrientes desde el medio hasta el injerto. La formación del callo que se da en la zona de unión del injerto es producto de la intensa actividad mitótica que se considera como condición básica para que sea posible la unión (Yerman and Brown, 1976). En microinjertos realizados en *Prunus* se pudo observar que el desarrollo de las células callosas proliferan principalmente del parénquima medular del patrón y del injerto (Aguilar *et al.*, 1990).

Posteriormente a la cuarta semana se observó la formación de nuevas hojas en la parte apical (Figuras 14e y f) de igual forma también se observarón yemas adventicias viables (Figura 14 g). De la octava a la decima semana se observó la apertura de las yemas con formación de nuevas hojas al mismo tiempo que ocurría la abscisión de las hojas del meristemo apical (Figuras 15a y b).

La Tabla 7 muestra los resultados en porcentaje de contaminación a la primer semana de establecido el cultivo y porcentajes de prendimiento a la segunda, cuarta y octava semana. Aquí se puede observar que en cuanto a la desinfestación de los explantes el tratamiento uno o testigo; descrito anteriormente, mostró un 94 % de contaminación. Por otro lado, los tratamientos dos y tres mostraron porcentajes del 85 y 78 % respectivamente, lo cual permite establecer un buen número de explantes libres de contaminantes sobre todo si se toma en cuenta que el establecer material *in vitro* proveniente de campo resulta un tanto difícil debido a la exposición constante de dicho material a los agentes contaminantes.

En el tratamiento cuatro se obtuvo un 63 % de contaminación permitiendo establecer alrededor del 40 % del material *in vitro* aséptico. Cabe señalar que la contaminación fúngica no afecta el prendimiento de los microinjertos pero si el desarrollo de los mismos. Estos resultados coinciden con lo reportado por (Materan *et al.*, 2008) donde señala que la contaminación bacteriana y fúngica es un factor limitante para el establecimiento *in vitro* de material proveniente de campo y que los trabajos que

indican la contaminación, son escasos y en su mayoría de ellos no especifican el procedimiento de desinfección superficial.

Tabla 8: Porcentaje de contaminación en microinjertos en diferentes tratamientos de desinfestación.

Tratamiento de desinfestación	No. de microinjertos	% microinjertos contaminados	% prendimiento		
			2 semanas	4 semanas	8 semanas
1	20	94	88	88	88
2	20	85	86	86	86
3	20	78	89	89	89
4	20	63	89	89	89

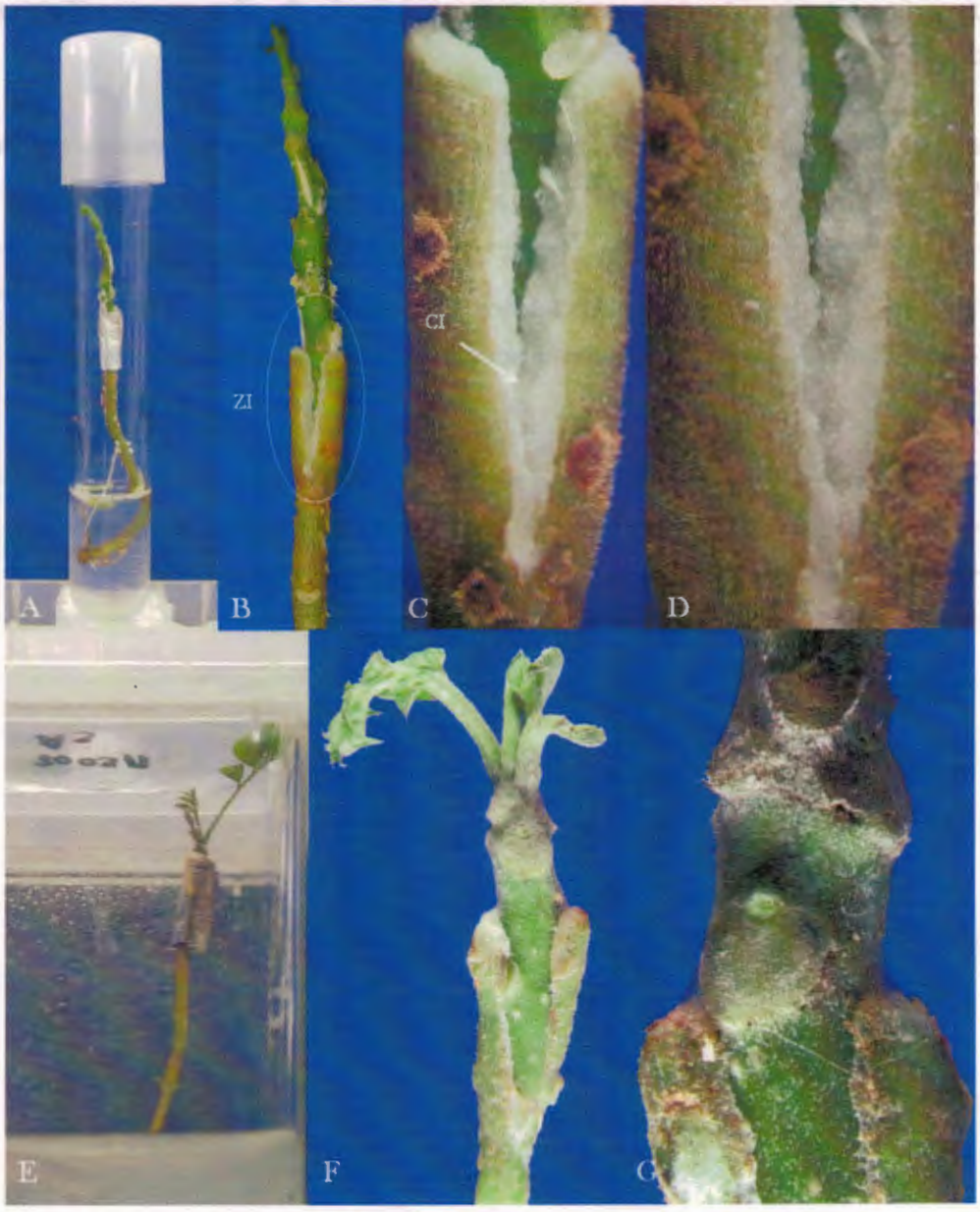


Figura 14: Microinjerto a dos semanas de iniciado el cultivo. a) injerto, b) zona de injertación (ZI), c y d) Formación de callo interfasico (CI), se aprecia claramente la cicatrización del microinjerto, e y f) microinjerto con nuevas hojas en la porción apical, g) yemas latentes.

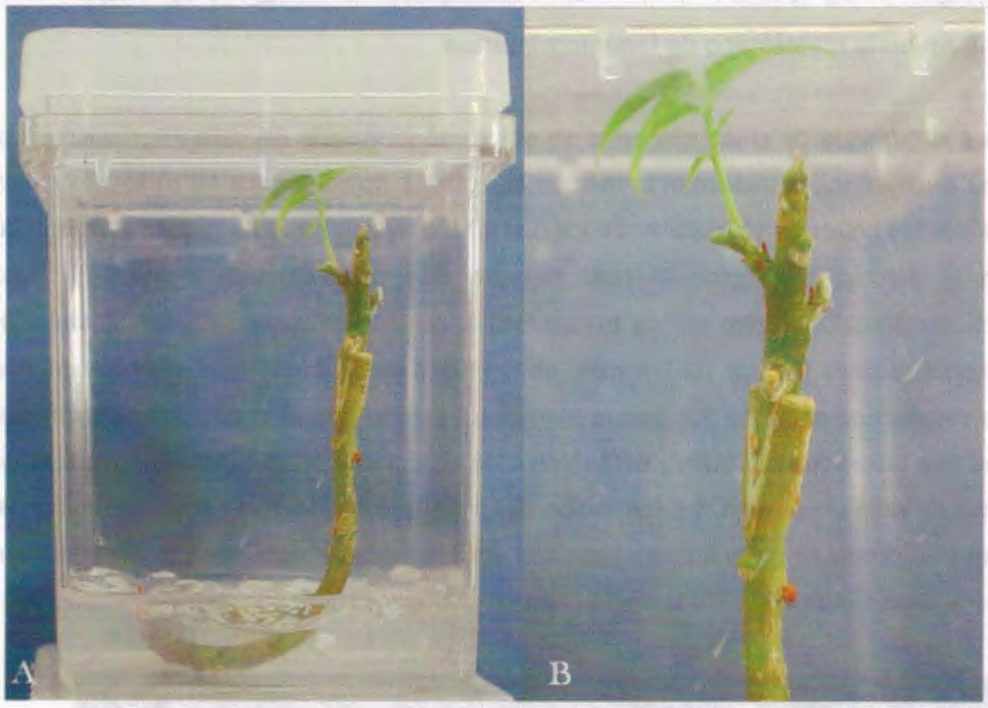


Figura 15: Microinjerto de cinco semanas. A) Nótese la formación de nuevas hojas en ápice, b) yemas en proceso de crecimiento

3.3.5 Análisis histológico de los microinjertos

Los microinjertos de cinco semanas de edad con formación de callo interfasico en la zona de injertación presentan formación de nuevas hojas (Figura 16 a) lo que indica una posible conexión vascular entre los dos tejidos injertados, dato que es corroborado con el estudio histológico el cual muestra que efectivamente existe una clara proliferación celular entre ambos tejidos lo que conlleva a una comunicación vascular entre los mismos (Figura 16b). Aguilar *et al.* (1990) encontraron que la unión continua que se produce entre las dos partes permite un estado dinámico de comunicación que a su vez favorece esta unión, este evento es vital para que la planta injertada actúe como un solo organismo. La formación del callo que se da en la zona de unión del injerto es producto de la intensa actividad mitótica que se considera como condición básica para que sea posible la unión (Yerman y Brown, 1976).

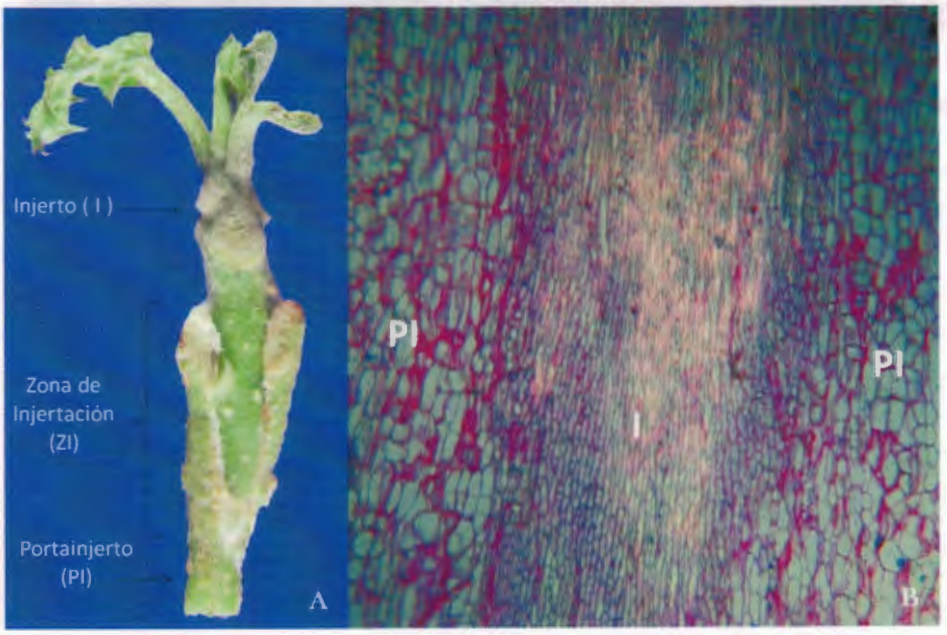


Figura 16: Análisis histológico del microinjerto. A) Injerto de cinco semanas de cultivo, B) imagen microscópica del corte longitudinal de la zona de Injertación.

Las comunicaciones intercelulares se dan por los plasmodesmos que existen entre las células del patrón y del injerto. Existen también conexiones citoplasmáticas entre protoplastos no relacionados y por puentes celulares que se forman entre células que no se encuentran en reproducción (Kollmann y Glockmann, 1985). Estas uniones primarias son necesarias por el significado funcional que representan, pues ocurren en el lugar mismo donde se interrumpe el transporte de sustancias (Kollmann y

Glockmann, 1985). Las células del callo ya diferenciadas en elementos del sistema vascular, xilema y floema, tienden a fusionarse con sus símiles de la otra planta al momento de perder su pared celular (Aguilar, 1990).

Este tipo de conexiones entre los nuevos tejidos vasculares formados y entre las dos plantas injertadas es solo posible en aquellas especies que tienen un alto grado de compatibilidad, pues estas uniones restauran el flujo de agua y nutrimentos en el injerto y establecen la fuerza mecánica suficiente para sostenerla unión del injerto (Parkinson *et al.*, 1987).

3.3.6 CONCLUSIONES

- La injertación de material adulto sobre portainjertos juveniles en condiciones de invernadero induce un cierto grado de rejuvenecimiento, el cual se ve evidenciado a través de la incapacidad de floración del material injertado lo contrario al material que fue establecido en agua bajo condiciones de invernadero mismo que presentó floración

- Es posible desinfestar y establecer material vegetal *in vitro* proveniente de campo mediante lavados con Tween 80, NaOCl y tratamientos con el fungicida comercial Swiht y antibiotico bencilpenicilina de 400 000 UL.

- La microinjertación de material adulto sobre portainjertos juveniles es una herramienta viable para el establecimiento *in vitro* de material seleccionado.

3.3.7 PERSPECTIVAS

El proceso de "envejecimiento" induce cambios en la morfología y fisiología de las plantas, lo que trae como consecuencia la disminución de las capacidades morfogénicas, especialmene en la capaciadad de enraizamiento y propagación vegetativa.

La injertación del material adulto sobre portainjertos juveniles induce un cierto grado de rejuvenecimiento que en *Cedrela odorata* se manifestó en forma de un crecimiento vigoroso y la ausencia de floración de los materiales adultos injertados, mientras que los material adultos no injertados se desarrollan poco y presentaron floración. Lo anterior sugiere que la injertación este modificando de alguna manera la expresión de ciertos genes implicados en la floración.

Sin embargo, para entender un poco más el proceso de rejuvenecimiento será necesario realizar estudios, enfocados a la busqueda de marcadores fisiológicos y moleculares que permitan identificar las diferentes fases del desarrollo de los injertos. Por ejemplo para entender el grado de rejuvenecimiento del tejido vegetal, estos estudios pueden ser enfocados desde un punto de vista epigenetico, cuantificando los patrones de metilación global del ADN, durante la evolución de los microinjertos. Otro enfoque puede ser el estudio de la expresión de genes expresados durante el proceso de injertación del material adulto y durante la floración.

Es importante tambien estudiar el establecimiento *in vitro* y el enraizamiento *ex situ* del material injertado durante diferentes tiempos de injertación, ya que esto permitira establecer si efectivamente el rejuvenecimiento mediante injertación favorece el establecimiento tanto *in vitro* como *ex situ* de material adulto seleccionado.

3.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, M. (1990). Obtención de Plantas de Cacao (Theobroma cacao L.) a partir de icroinjerto de Embriones Somáticos. Tesis MSc. Costa Rica, Turrialba, CATIE. 31 p.

Berlin, G.P.J., Miksche, P (1976). Botanical microtechnique and cytochemistry. 3rd ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

Bonga, J.M y Aderkas, V (1992). Rejuvenation of tisses from mature conifers and its implications for propagation *iii vitro.* En: M.R. Ahuja y W. J. Libby (eds). Clonal forestry I. Genetics and Biotechnology. Springer.

Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López-Vela, D., Toribio, M (2005). La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. En: Aranda I, Cervera MT, Pardos M (eds.) Ecophysiology: from genes to ecosystems. Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales, 14 (3): 345-357.

Cortizo, M., Alonso, P., Fernández, B., Rodríguez, A., Centeno, M., Ordás, R (2004). Micrografting of mature stone pine (*Pinus pinea* L.) trees. *Ann. For. Sci. 61*: 843-845.

Fraga, M., Cañal, M., Aragonés, A., Rodríguez, R (2002 a). Factors involved in Pinus radiata D. Don. micrografting. *Ann. For. Sci. 59*: 51-157.

Fraga, M., Cañal, M and Rodríguez, R (2002 b). Phase-Change related epigenetic and phyisiological changes in *Pinus radiata* D. Don. Planta, 215:672-678

Hartmann y Kester's (2002). Plant Propagation: Principles and Practices. Prentice Hall, Inc.

Joshi, I., Bisht, P., Sharma, V.K., Uniyal, D.P (2003). *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F_1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). Silvae Genetica, v. 52, n. 3-4, p. 110-113.

Juárez-Gómez, J (2008). Desarrollo de un protocolo para la micropropagación de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) empleando biorreactores de inmersión temporal BIOMINT®. Tesis de licenciatura. Centro de Investigación Cientifica de Yucatan. México, 35-36 p.

Kollmann, R., Glockmann, Ch (1985). Studies on graft unions 1. Plasmodesmata between cells of plant belonging to different unrelated taxa. Protoplasma. 124: 224-235.

Materán, M., Vega, M., Sánchez-Olate, M., Sáez, K., Rodríguez, R and Ríos, D (2008). Reactivation of elite *Pinus radiata* D. Don. plant tissue by *in vitro* micrografting. Interciencia 33:66-70.

Murashige, T., Skoog, F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: Pg. 53-58.

Murashige, T., Bitters, W P., Rangan,T.S., Nauer, E., Roistacher, C.N., Holliday, P.B (1972). A technique of shoots apex grafting and its utilization toward recovering virusfree citrus clones. Hort. Science, 7(2): 118119.

Mhatre, M and Bapat, V (2007). Micrografting in grapevine. En Jain SM, Haggman H (Eds.) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer. Holanda. pp. 249-258.

Mcgowran, L.C., Lius, S., Huang, B.L., Murashige, T., El Fatih Mahdi y Van Gundy, R (1998). Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*. Plant Physiol. 98: 166-173.

Parkinson, M., Jeffree, C., Yerman, M (1987). Incompatibility in cultured explant grafts between members of the Solanaceae. New Phytologist. 107: 489-498.

Pliego, A. y Murashige, T (1987). Possible rejuvenation of adult avocado by graftage on to juvenile rootstocks *in vitro*. Hort. Sci. 22: 1321-1324.

Salisbury, F and Ross, C (2000) *Fisiología de las Plantas*. Paraninfo. Madrid, España. 985 p.

Siniscalco, C. y Pavolettoni, L (1988). Rejuvenation of Eucalyptus x Trabutii by successive grafting. Acta Horticulturae 227: 6258-6260.

Wendling I. y Xavier, A (2001). Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. Floresta e Ambiente 8(1):187-194.

Yerman, M; Brown, R (1976). Implications of formation of graft union for organization in the intact plant Annals of Botany. 40; 1265 – 1276.

Zapata, J (2002). *Caracterización Morfológica de la Micropropagación en* Pinus radiata *D. Don.* Tesis. Universidad de Concepción. Chile. 160 pp.

Zecca, A (1995).Incompatibilidad del injerto peral – membrillo. Facultad de Ciencias Agrarias. Río Negro-Argentina. Visitada 25 de noviembre del 20012, http://www.intecace.com.ar/articulos/incompatibilidad.htm.