

Multiplicación *in vitro* del Piñón Azul *Pinus maximartinezii* (Rzedowski)

(Con 3 Tablas)

In vitro multiplication of the Piñón Azul *Pinus maximartinezii* (Rzedowski)

(With 3 Tables)

Ojeda-Zacarías¹ Ma del Carmen, Hugo A Luna-Olvera², Lilia H Morales-Ramos², María J Verde-Star², Teresa E Torres-Cepeda², Benito Pereyra-Alfárez², Leobardo Iracheta-Donjuan³, Emilio Olivares-Sáenz⁴, Raúl Salazar-Sáenz⁴, Elizabeth Cárdenas-Cerda⁴

Resumen. *Pinus maximartinezii* (Rzedowski) es una especie endémica en peligro de extinción, confinada a una población de aproximadamente 2000 a 2500 árboles maduros en una superficie de 400 ha. En estos casos, es necesario establecer técnicas de propagación que permitan incrementar la disponibilidad del material vegetativo.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo para la multiplicación *in vitro* de *Pinus maximartinezii* por medio de organogénesis. Embriones cigóticos y cotiledones obtenidos de semillas maduras fueron colocados en los medios de cultivo DCR y GD adicionados con 0.3 mg/l-1 y 0.5mg/l-1 de BAP; 0.01 mg/l-1 de NAA, permaneciendo por 6 semanas en condiciones de 26°C ± 2°C y un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. Posteriormente los explantes fueron transferidos a los medios de cultivo (DCR y GD) sin reguladores de crecimiento a intervalos de 15 días, durante 6 semanas. En la siguiente etapa (alargamiento de yemas), la variable evaluada fue número de explantes con yemas. Por último los explantes fueron transferidos a los mismos medios de cultivo sin reguladores de crecimiento, adicionados con 0.1% de carbón activado, permaneciendo por 8 semanas; evaluándose posteriormente el número de brotes por embrión.

Los análisis de varianza mostraron diferencia significativa en medios de cultivo y concentración de reguladores de crecimiento.

Abreviaturas: BAP=Bencilaminopurina; NAA=Ácido Naftalenacético; DMS=Diferencia Mínima Significativa; DCR=(Gupta y Durzan, 1985); GD=(Gresshoff y Doy, 1972); mg/l-1= miligramos por litro; gl-1= gramos por litro; h= horas.

¹ Instituto Tecnológico de Nuevo León, Eloy Cavazos No 2001, Guadalupe, Nuevo León, CP 67170.

² Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Apdo Postal 38F, Pedro de Alba, s/n, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. México, CP. 66450.

³ Investigador del Instituto Nacional Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias; Campo Experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico Chiapas, Méx. CP. 30870

⁴ Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Agronomía, Carretera Zuazua-Marín Km 17.5, Marín, N.L., CP. 66700, e-mail ojedacz@yahoo.com.mx

Agradecimiento: al Consejo Nac. De Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado en la realización de mis estudios Doctorales.

Recibido 24.III.2006; aceptado 31.VIII.2006

Palabras clave: Micropropagación, coníferas, Piñón azul, primordios foliares, organogénesis

Abstract. *Pinus maximartinezii* (Rzedowski) is an endemic endangered species, confined to a single population of approximately 2000 to 2500 mature trees. It covers about 400 ha in southern Zacatecas, Mexico. The success of tissue culture techniques for germplasm preservation depends on regeneration of cultures. The objective of this study was to achieve an *in vitro* proliferation protocol using organogenesis technique for *Pinus maximartinezii*. Mature seeds were surface sterilized in 6% H₂O₂ v/v. Isolated cotyledons and zygotic embryos were cultured on shoot induction media. DCR and GD media were supplemented with 0.3 and 0.5 mg l⁻¹ BAP; 0.01 mg l⁻¹ ANA and vitamin solution. Explants were incubated at 26 ± 2°C under a 16h photoperiod. The explants were transferred every 15 days to hormone-free medium (DCR and GD) for a period of 6 wk for bud development. The number of explants forming buds was determined. After induction of buds, the explants were transferred to a hormone-free basal medium, to which 0.1% activated charcoal was added. After 8 wk, the number of shoots per embryo was evaluated. Effects of either basal media or plant growth regulator concentrations were significantly different (p<0.05).

Abbreviations: DCR=Gupta & Durzan, 1985; GD=Gresshoff y Doy, 1972; BAP=bencilaminopurine; ANA=Naftalen acetic acid.

Key words: Micropropagation, conifers, Piñon Azul, foliar primordial, organogénesis

La importancia económica de los bosques de coníferas en México es muy grande; el género *Pinus* constituye la mayor parte de la riqueza forestal por su amplio rango de distribución (Martínez, 1953). El piñón azul o maxi piñón (*Pinus maximartinezii* (Rzedowski), ha sobrevivido a una restricción genética extrema ya que está confinado a una sola población de aproximadamente 2000 a 2500 árboles maduros en el sur del estado de Zacatecas, México y se encuentra en la lista de las especies en peligro de extinción (Ledig et al., 1999; Norma Oficial Mexicana, 1994).

En estos casos la propagación *in vitro* ha demostrado ser un método exitoso para la conservación y mantenimiento de especies en peligro de extinción (Mata et al., 2001). Sin embargo, se han observado diferentes respuestas con la utilización de medios de cultivo y reguladores de crecimiento (Ojeda, 1992). Por lo que, es necesario ajustar el protocolo de regeneración para cada una de las especies (Go et al., 1993; Saravitz, 1990). Diversos investigadores, utilizando cotiledones de embriones maduros encontraron que concentraciones distintas de benciladenina favorecen el desarrollo de brotes *in vitro* (Go et al., 1993; Hargreaves et al., 2004; Patel y Torphe, 1994). Así mismo, Niella y Rocha (2001) utilizando cotiledones provistos de hipocotilos obtuvieron una mayor respuesta con la utilización de BA. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo para la multiplicación *in vitro* de *Pinus maximartinezii*, estudiando la variable número de brotes por explante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desinfección de la semilla.- Se obtuvieron semillas intactas de conos maduros de *Pinus maximartinezii*. Para su desinfección se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (6% ingrediente activo) y detergente durante 5 min; estas fueron cepilladas y lavadas con agua. Se seleccionaron semillas de aprox. 2.5 cm y se eliminaron las cubiertas. Posteriormente las semillas seleccionadas se llevaron a una campana de flujo laminar colocán-

dose en una solución de H₂O₂ de 12.5 vol durante 45 min; se enjuagaron con agua bidestilada esterilizada y se transfirieron a etanol 70% por un minuto; a continuación se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (6% ing. activo) adicionado de 0.5cc de Tween-20 (poliixetileno sorbitan monoivalente) durante 5 min. Finalmente se enjuagaron por 5 min con agua bidestilada esterilizada.

Se utilizaron los medios de cultivo DCR y GD (Gresshoff y Doy, 1972; Gupta y Durzan, 1985). Adicionados con 0.3mg⁻¹ y 0.5mg⁻¹ de BAP, respectivamente; 0.01mg⁻¹ de NAA; Sacarosa 30g⁻¹ para DCR y 20g⁻¹ para GD; 5g⁻¹ de agar gel y ajustándose el pH a 5.7. Se esterilizaron a 121°C y 1 atm. de presión durante 15 min. Los tratamientos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos a los que se expusieron cotiledones y embriones cigóticos maduros de *Pinus maximartinezii* para estudiar su respuesta *in vitro*.

Factor A Explante	Factor B Medio Cultivo	Factor C Concentración de reguladores de crecimiento mg ⁻¹	Número de tratamiento
Cotiledones	DCR	0.3	1
		0.5	2
	GD	0.3	3
		0.5	4
Embrión	DCR	0.3	5
		0.5	6
	GD	0.3	7
		0.5	8

Diseño del experimento.- Se utilizó un diseño totalmente al azar y con arreglo factorial 2³ factor A: explantes; factor B: medios de cultivo; factor C: concentración de los reguladores de crecimiento donde la variable dependiente a evaluar fue número de brotes por embrión.

Inducción de yemas.- Cotiledones de embriones maduros y embriones cigóticos completos fueron colocados en los tratamientos señalados, incubándose durante seis semanas por 16/8 h-luz, a 2000 lux y 26°C ± 2°C para la inducción de yemas.

Alargamiento de yemas.- Los cotiledones y embriones fueron transferidos a frascos con medio DCR ó GD sin reguladores de crecimiento y disminuyendo la sacarosa a la mitad de su concentración. En estas condiciones permanecieron por seis semanas. Al final de esta etapa se evaluó el número de yemas que presentaban al menos 2 primordios foliares bien desarrollados.

Formación de brotes.- Los explantes con yemas desarrolladas se transfirieron a los mismos medios de cultivo pero adicionados con 0.1% de carbón activado manteniéndose estos durante 8 semanas. Para esta etapa se evaluó la variable número de brotes por embrión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de yemas. En la primera semana de iniciado el cultivo los cotiledones presentaron la formación de estructuras nodulares semejantes a callos. Al transcurrir seis semanas en el medio se hicieron evidentes primordios de yemas.

Sin embargo no se presentaron diferencias significativas ($p>0,05$) para ningún factor. Los resultados se muestran en la Tabla 2. El tiempo requerido para esta respuesta coincide con lo observado en otras especies de pino (Ojeda, 1992; Patel y Thorpe, 1994; Sen et al., 1994).

Tabla 2. Promedios obtenidos a las seis semanas en la etapa de alargamiento de yemas, evaluándose el número de primordios de yemas en <i>Pinus maximartinezii</i> .					
Explante		Medio de Cultivo		Concentración de reguladores de crecimiento mg l^{-1}	
Cotiledones	Embrión	DCR	GD	0.3	0.5
1.093 α	1.375 α	1.312 α	1.156 α	1.281 α	1.187 α

Formación de brotes.- Para la evaluación del número de brotes se tomaron en cuenta solamente las yemas que mostraban al menos dos primordios foliares bien desarrollados.

Tabla 3. Número de brotes promedio de <i>Pinus maximartinezii</i> obtenidos a las 8 semanas en la etapa de formación de brotes.			
Medio de cultivo		Concentración de reguladores de crecimiento mg l^{-1}	
DCR	GD	0.3	0.5
4.031 α	2.844 β	2.969 α	3.906 β

En general el medio de cultivo DCR mostró mayores resultados ($p<0,05$) que el medio GD (Tabla 3). Así mismo, al analizar la concentración de los reguladores de crecimiento se encontró mayor respuesta ($p<0,05$) con 0.5mg l^{-1} BAP en comparación con 0.3mg l^{-1} (Tabla 3).

Aunque no es fácil definir la causa por la cual cotiledones provenientes de un mismo embrión presentan diferencias en su respuesta, es necesario ajustar el protocolo de regeneración para cada especie de pino (Pérez-Bermúdez y Sommer, 1987). Algunas especies responden exitosamente a dosis bajas de BA y otras responden mejor a dosis mayores de citocininas (Saravitz, 1990). La respuesta observada del presente trabajo coincide con lo reportado por Niella y Rocha (2001). Estos Autores obtuvieron una mejor respuesta con altas concentraciones de BA utilizando cotiledones provistos de hipocotilos. Así mismo Ojeda (1992) y Lambardi et al. (1993) encontraron en *Pinus halepensis* que conforme se incrementó la concentración de BA, la respuesta de los explantes fue mayor.

La mayoría de las regeneraciones *in vitro* del género *Pinus* ha sido el resultado de la utilización de embriones maduros así como de la concentración de los reguladores de crecimiento (Martínez-Pulido et al., 1992; Patel y Thorpe, 1994). En general la mayor respuesta se obtuvo a partir de embriones cigóticos completos en el medio DCR utilizando 0.5mg l^{-1} de BAP.

REFERENCIAS

- Go NE, GD Pérez-Orosco, SC Halos, In vitro response of embryos from different provenants of *Pinus caribaea* var. *hondurensis* morelet. Plant cell, tissue and organ culture 32 (1993) 1.
- Gresshoff PM, CH Doy, Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. Planta 107 (1972) 161.
- Gupta PK, DJ Durzan, Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant cell Rep 4 (1985) 177.
- Hargreaves C, L Grace, S Van der Maas, C Reeves, Cryopreservación de *Pinus radiates* zygotic embryo cotyledons: effect of storage duration on adventitious shoot formation and plant growth after 2 years in the field. Canadian Journal of Forest Research 34 (2004) 600.
- Lambardi M, KK Sharma, TA Thorpe, Optimization of in vitro bud induction and plantlet formation from mature embryos of alepo pine (*Pinus halepensis* Mill) In vitro cell Dev Biol 29 (1993) 189.
- Ledig FT, TM Conkle, B. Bermejo-Velazquez, T Eguiluz-Piedra, PD Hodgskiss, DR Johnson, WS Dvorak, Evidence for an extreme bottleneck in a rare mexican oniyon: Genetic diversity disequilibrium and the mating system in *Pinus maximartinezii* Evolution 53 (1999) 191.
- Martínez M, Las pináceas Mexicanas. Sec Agric Ganad Subsec Recursos Forestales y de Caza. México (1953^a) 362.
- Martínez-Pulido C, IS Harry, TA Thorpe, Optimization of bud induction in cotyledonary explants of *Pinus canariensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29 (1992) 247.
- Mata MR, V y M Chávez, RB Boettler, In Vitro regeneration of plantlets from in mature zygotic embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, an endemic Mexican endangered species. In vitro cellular y Developmental Biology; 1 (2001) 73.
- Niella F, P Rocha, Research and Development of vegetative Propagation Techniques for *Pinus sp.* In the Northeast Region of Argentina. Proceedings of the 26 Th Biennial Southern Forest Tree Improvement Conference. June 26-29, 2001, Ed: Jeffrey FD, Dean-Georgia University, Athens, GA, USA (2001) 32.
- Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-94, que determina las especies de flora y fauna silvestres terrestres acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial y que establece especificaciones para su protección. Diario Oficial (16 de mayo de 1994), (2001) 2.
- Ojeda, Inducción de Organogénesis y Embriogénesis Somática de *Pinus cembriodes* y *Pinus halepensis*. Tesis de Maestría, FA-UANL. Mty. México (1992) 44.
- Patel KR, TA Thorpe, In vitro differentiation of plantlets from embryonic explants of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl ex loud) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 3 (1994) 131.
- Pérez-Bermúdez P, HE Sommer, Factors affecting adventitious bud in *Pinus elliottii* (Engelm) embryos cultured in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 11 (1987) 25.
- Saravitz H, In vitro propagation of Fraser fir (*Abies fraseri*) and Virginia pine (*Pinus virginiana*) from embryonic explants. Ph.D Dissertation. North Carolina State University. (1990) 108.
- Sen S, ME Magallanes-Cedeño, RH Kamps, CR Mckinley, RJ Newton, In vitro micropropagation of Afghan pine. Can Jour For Res 24 (1994) 1248.