

RESPUESTAS MORFOGÉNICAS *in vitro* DE ESPECIE VEGETAL MADERABLE EN LA MIXTECA POBLANA

in vitro MORPHOGENIC RESPONSES OF TIMBER PLANT SPECIES IN THE MIXTECA POBLANA

Aguilar Jiménez D.^{1*}, González Vicente R. D.², Herrera López H.², Salgado Bravo R.¹, Isidoro Flores A.¹

¹Programa Educativo de Agrobiotecnología. ²Programa Educativo de Agricultura Sustentable y Protegida. Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros. Prolongación Reforma No. 168, Barrio de Santiago Mihucán, C. P. 74420, Izúcar de Matamoros, Puebla, México.

*Autor para correspondencia: aguilard229@gmail.com

Recibido: 10/febrero/2023

Aceptado: 27/junio/2023

RESUMEN

La especie vegetal conocida comúnmente como “palo blanco” (*Lysiloma sp.*), es una especie maderable que se encuentra en la Mixteca Poblana. Su semilla no presenta problemas de germinación, sin embargo, al germinar con la menor humedad ambiental y al no contar con suelo que la cubra, los embriones se mueren por las condiciones ambientales que existen en la Mixteca Poblana. Es una especie que puede emplearse como combustible (leña), para cercos vivos o para programas de reforestación. Por ello, en el presente trabajo se establecieron las condiciones *in vitro* para evaluar fitorreguladores de crecimiento vegetal y promover respuestas

morfogénicas en un medio MS modificado. Para ello, se emplearon 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido-indolbutírico (AIB) en cuatro concentraciones para formar un arreglo factorial 4x4x2 y evaluar porcentaje de viabilidad, número y longitud de brotes y de raíz, presencia de callo, necrosis y porcentaje de explantes con respuesta. Los mejores resultados para obtención de brotes (cinco brotes por explante) se obtuvieron con AIB 1.0 mg.L⁻¹ en presencia de BAP con respecto al control (cero brotes).

Palabras clave: Brotes, viabilidad, callo, necrosis, Mixteca.

ABSTRACT

The plant species commonly known as "palo blanco" (*Lysiloma* sp.) is a timber species found in the Mixteca Poblana. Its seeds do not present germination problems; however, when germinating with the lowest environmental humidity and without soil to cover it, the embryos die because of the environmental conditions that exist in the Mixteca Poblana. It can be used as fuel (firewood) for live fences or for reforestation programs. Therefore, in the present study, we sought to establish in vitro conditions to evaluate plant growth phytohormones and promote morphogenic responses in modified MS medium. For this purpose, 6-Benzylaminopurine (BAP) and indole-butyric acid (IBA) were used at four concentrations to form a $4 \times 4 \times 2$ factorial arrangement and to evaluate the percentage of viability, number and length of shoots and roots, presence of callus, necrosis, and percentage of explants with response. The best results for obtaining plant shoots were obtained with AIB 1.0 mg.L^{-1} in the presence of BAP.

Keywords: Shoots, viability, callus, necrosis, Mixteca.

INTRODUCCIÓN

La deforestación es uno de los problemas más graves que atraviesa la humanidad debido fundamentalmente a la necesidad del hombre de obtener recursos del ecosistema. La tala abusiva, los incendios forestales y el inadecuado manejo silvícola sin pensar en las futuras generaciones, pueden conllevar a la desaparición de los bosques del planeta generando impacto negativo en los ecosistemas (Luján, 2003). Por ello el manejo forestal sustentable de especies tropicales maderables ha crecido en las últimas décadas (FAO, 2006). Después de las especies maderables de alto valor comercial, como la caoba (*Swietenia macrophylla* King) y el cedro (*Cedrela odorata* Cham. y Schltld.), una de las principales especies en volúmenes aprovechados y con demanda creciente en la Península de Yucatán es el Tzalam (*Lysiloma* spp.) (López-Torres y Tamarit-Urias, 2005). Sin embargo, en la Mixteca Poblana, existe una especie maderable valiosa para reforestar, de nombre común "palo blanco" (*Lysiloma* sp.) según Ceccon *et al.* (2002), sus frutos contienen alta cantidad de proteínas que puede servir como forraje, retiene el suelo y agua, y además, su madera es un excelente material para emplearse como combustible, pues se ha visto que tarda mucho tiempo encendido

como carbón. Por ello, es fundamental contar con protocolos para su propagación ya que se están plantando muchas hectáreas de maguey mezcalero, no obstante, no se está atendiendo el material que se empleará como combustible para la cocción de las piñas y la destilación del mezcal, lo cual, podría generar un problema ambiental al aumentar la deforestación de árboles (Compilación personal, 2022). En ese sentido, la multiplicación de estas especies se efectúa de forma convencional por medio de semillas y por estacas. Sin embargo, la reproducción por injerto generalmente se emplea en los programas de mejoramiento genético y su uso es más frecuente en la fruticultura. Estas vías de propagación son limitadas, aún más cuando se desea introducir las plantas a gran escala en sistemas integrales de producción con respuesta directa a la industria. Las especies forestales tienen muchos problemas de propagación que responden más a las peculiaridades fisiológicas de las semillas de las plantas leñosas, que a la variabilidad genética de las especies (Murillo *et al.*, 2012). Además, el éxito de una plantación forestal es fuertemente dependiente de la calidad de las plantas que se utilicen. Es así que, la calidad de una planta está definida por su comportamiento final en el terreno, el que está regulado por sus atributos

morfológicos y fisiológicos y por su interacción con el ambiente del sitio de plantación (Navarro y Palacios, 2004; Chávez y de Feria, 2012).

En ese tenor, los métodos de cultivo *in vitro* constituyen una vía de propagación con resultados satisfactorios en los coeficientes de multiplicación y por las posibilidades de éxito de las plantaciones forestales en campo. Los principales avances del cultivo *in vitro* de tejidos han permitido la multiplicación de especies de interés mediante organogénesis y embriogénesis somática (ES) (Daquinta *et al.*, 2000; Barbón, 2011). Para ello, se cuenta con algunos estudios científicos como lo publicado por Carranza *et al.* (2013) en caoba (*Swietenia macrophylla*), que fue propagada *in vitro* con un medio de cultivo MS y distintos niveles de bencilaminopurina (BAP) y ácido indolbutírico (AIB), obteniéndose 70 % de brotes con 2.0 mg.L⁻¹ de BAP en combinación con 1.0 mg.L⁻¹ de AIB. Los mejores brotes se colocaron en medio de cultivo MS con diferentes concentraciones de ANA para facilitar su enraizamiento y la respuesta apareció a los 21 días de su cultivo, y el mayor porcentaje de sobrevivencia (65 %) lo obtuvieron al combinar 2.0 mg.L⁻¹ de BAP y 1.0 mg.L⁻¹ de ANA. Para el mismo fin, Collado *et al.*

(2004) alcanzaron un 63.9 % de explantes con respuesta (brotes) con 0.2 mg.L^{-1} de 6-BAP empleando ápices y segmentos nodales de caoba. Como se puede observar, el número de brotes es muy variable y depende del contenido de citoquininas así como de otros fitorreguladores endógenos en los explantes de acuerdo con Bernal *et al.* (2009). Por ello, el objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones e interacción de fitorreguladores para obtener respuestas morfogénicas *in vitro* a partir de ápices vegetativos de “palo blanco” (*Lysiloma sp.*). Lo anterior, sin olvidar alguna estrategia de siembra asociada de preferencia, que no genere otro problema ambiental.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del P.E. de Agrobiotecnología de la Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros. Ubicada en Prolongación Reforma No. 168, Barrio de Santiago Mihucán, Izúcar de Matamoros, Puebla. C.P. 74420.

Material vegetal

Se emplearon semillas cigóticas a partir de la especie “palo blanco” (*Lysiloma sp.*), las cuales fueron colectadas en bolsas de papel

directamente de un sólo árbol en el Municipio de San Miguel la Toma, Chietla, perteneciente al estado de Puebla, México. Las semillas colectadas fueron a partir de vainas maduras (color café y que sonaban al agitarse).

Condiciones de cultivo

Se emplearon las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) (MS) al 50 % de su concentración, adicionando 0.4 mg.L^{-1} de tiamina y 100 mg.L^{-1} de mio-Inositol, sacarosa 3 %. Después de ajustar el pH a 5.7 ± 0.01 , se agregó Agar bacteriológico 0.54 %, se vertieron 15 mL por tubo de ensayo y se esterilizaron mediante una autoclave de vapor de agua tipo horizontal a 1.5 kg.cm^2 durante 25 minutos.

Desinfección y siembra de semillas para estimar la viabilidad

Con base a la metodología publicada por Aguilar-Jiménez y Rodríguez-De-La-O (2020), las semillas se lavaron con una solución de agua y detergente durante 1 minuto, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces y se colocaron en una solución de fungicida y bactericida (1.0 g.L^{-1}) por cinco minutos. Pasado el tiempo, la solución se decantó y se colocaron en una solución de peróxido de hidrógeno 1:1 con agua destilada estéril por tres minutos. En seguida se llevaron al área

de siembra y dentro de la campana de flujo laminar, se decantó la solución desinfectante y se sembraron las semillas en el medio antes descrito; una semilla por recipiente sin ningún enjuague y con cien repeticiones. Los tubos de ensayo se sellaron y se etiquetaron para trasladarse al área de incubación y monitorear la germinación.

Inducción de respuestas morfogénicas a partir de ápices vegetativos de *Lysiloma sp.*

Se empleó el medio de cultivo MS antes descrito y se dividió en partes iguales para agregar por separado: BAP y AIB en cuatro concentraciones diferentes (0.0, 0.3, 0.5 y 1.0 mg.L⁻¹), las concentraciones definidas fueron por el tipo de explante, el cual contiene de forma intrínseca varias sustancias, entre ellas varios fitorreguladores, formando un diseño factorial 4x4x2 con cinco repeticiones cada uno. Después de ajustar pH a 5.7 ± 0.01, se agregó agar bacteriológico 0.54 %, se vertieron 15 mL por tubo de ensayo y se esterilizaron mediante una autoclave de vapor de agua tipo horizontal a 1.5 kg.cm² durante 25 minutos. Una vez que los tratamientos se enfriaron y gelificaron, se obtuvieron ápices vegetativos con aproximadamente 1.0 cm de longitud a partir de las semillas germinadas. Se

sembró un ápice vegetativo por recipiente y los tubos de ensayo se sellaron, se etiquetaron para trasladarse al área de incubación durante seis semanas y se registraron datos de las variables: número y longitud de brotes, formación y longitud de raíz, presencia o ausencia de callo o necrosis de tejidos.

Análisis de datos

El diseño experimental fue completamente al azar, se consideró a cada recipiente con un ápice vegetativo como unidad experimental con 5 repeticiones cada tratamiento. Una vez registrados los datos de respuesta a las 6 semanas, se analizaron mediante Microsoft Excel las variables: número y longitud de brotes (media aritmética), tipo de callo (3, 2, 1 o 0), nivel de necrosis (3, 2, 1 o 0) y porcentaje de explantes con respuesta.

3: Callo o necrosis abundante; 2: callo o necrosis moderada; 1: indicios de callo o necrosis; y 0: ausencia de ambas respuestas.

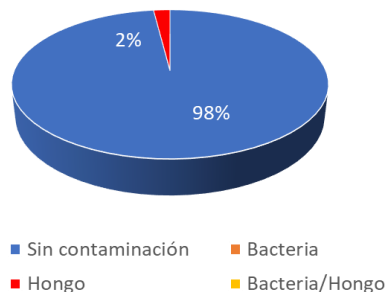
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección y siembra de semillas para estimar la viabilidad

El éxito en un proyecto de cultivo de tejidos vegetales depende mucho del protocolo de desinfección, ya que, si no se

puede cruzar esta etapa, no se puede dar continuidad a dicho proyecto (Hurtado y Merino, 2000 y Kondamudi *et al.* (2009). En este caso, a pesar de realizar la colecta de las semillas de *Lysiloma sp.* en el campo, no se presentaron problemas serios de contaminación, sólo en 2 % de las semillas sembradas creció un hongo de color blanco (Figura 1), y con el paso de los días, se tornó de color verde pistache, que de acuerdo con sus características morfológicas puede ser *Penicillium sp.* (Moreno-Limón *et al.*, 2011).

Figura 1. Porcentaje de respuesta de semillas *in vitro* a microorganismos contaminantes después de la desinfección.



Fuente: elaboración propia.

Es importante mencionar que el empleo de peróxido de hidrógeno no sólo pudo influir en la eliminación de microorganismos contaminantes, también pudo haber influido en estimular la germinación como publicó Mayo-Mosqueda *et al.* (2017), quienes obtuvieron mejor porcentaje de germinación (84.59 %) en semillas de *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* al emplear el

mismo desinfectante, resultados que coinciden con los obtenidos en este trabajo de *Lysiloma sp.* (Figura 2). Sin embargo, la respuesta obtenida indica que las semillas de *Lysiloma sp.* tienen excelente viabilidad al haberse sembrado en el mismo año de su colecta y, por lo tanto, las semillas pueden ser fuentes de explantes para el establecimiento exitoso del cultivo bajo condiciones *in vitro*. Con lo cual, se puede mantener la diversidad genética de la especie (Arzate-Fernández *et al.*, 2019) si las plantas micropropagadas son llevadas a repoblar hábitats nativos.

Figura 2. Porcentaje de semillas viables (germinadas).



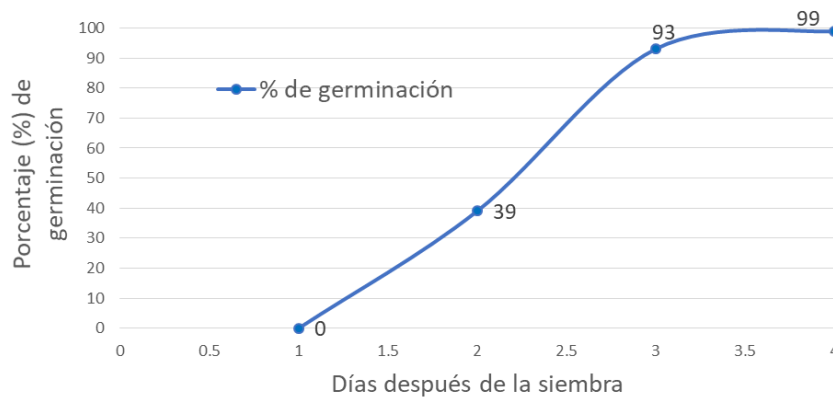
Fuente: elaboración propia.

Por otra parte, es importante mencionar que las semillas de especies vegetales de la familia *Leguminosae*, se caracterizan por presentar altos índices de germinación y viabilidad con relación a otro tipo de plantas (Hartmann y Kester, 2001), lo cual puede ser el factor para haber obtenido alto porcentaje de semillas viables en *Lysiloma*

sp. Sin embargo, su colecta fue en época de lluvias, factor que pudo influir para activar la germinación y por las condiciones de temperatura existentes, el embrión podría haber muerto. Con base a ello, fue necesario realizar dicho experimento para evitar

certidumbre sobre la viabilidad de las semillas colectadas. No obstante, como se puede observar en la Figura 3, las semillas iniciaron su germinación al otro día de sembradas *in vitro*, lo cual corrobora que estaban en excelente estado fisiológico.

Figura 3. Porcentaje de germinación de semillas de *Lysiloma sp.* días después de la siembra.



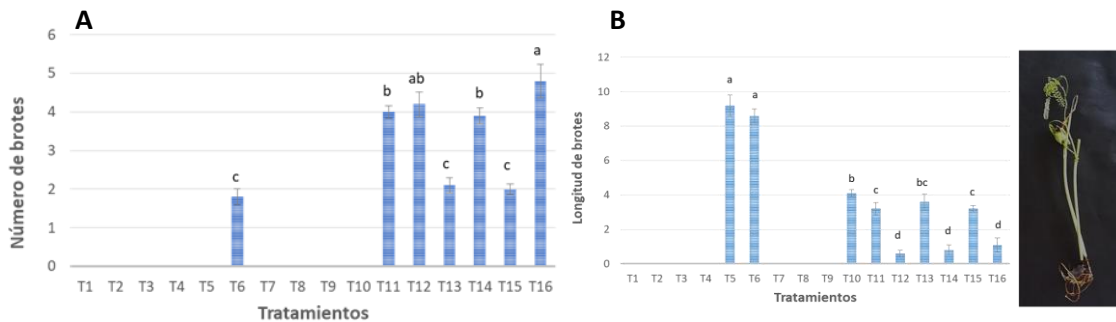
Fuente: elaboración propia.

Inducción de respuestas morfogénicas a partir de ápices vegetativos de *Lysiloma sp.*

En el caso de los tratamientos 14, 15 y 16, la respuesta para formación de brotes coincide con Aguilar y Rodríguez (2018b), quienes mencionan que la presencia de AIA tiene un papel importante en la formación de brotes en *Agave marmorata*. En el caso de *Lysiloma sp.*, esos tratamientos formaron varios brotes pequeños con forma

de coliflor o en forma de roseta cuando se encuentra la presencia de AIB, la cual, necesita de la presencia de BAP, ya que cuando no hubo BAP, la respuesta no fue favorable para esta variable. No obstante, la formación de brotes regularmente diferenciados dependió de la concentración de BAP, ya que su presencia favoreció la formación y longitud de nuevos brotes de forma directa (Figura 4A).

Figura 4. A) Formación de brotes por tratamiento a partir de ápices vegetativos en *Lysiloma sp.* cultivada in vitro (media aritmética), B) Longitud de brotes in vitro de *Lysiloma sp.* por tratamiento (media aritmética \pm desviación estándar).



Fuente: elaboración propia.

Con respecto a variables cualitativas, el callo originado en el tratamiento seis (Cuadro 2), es el único con apariencia homogénea y de color verde intenso; coincidiendo con lo publicado por Aguilar y Rodríguez (2018b), quienes reportan que las concentraciones en igual cantidad de esos fitorreguladores en *Agave marmorata*, presentaron un efecto organogénico directo, sin embargo, dependiendo de la

concentración pueden formar diferentes tipos de callo. En este caso, la respuesta es a muy baja concentración, lo que indica, que dichas respuestas van a depender de la especie vegetal trabajada, sin embargo, esos constituyentes parecen ser fundamentales sin dejar de considerar, que la concentración de sales MS empleadas para *Lysiloma sp.*, están al 50 % de lo empleado por los autores antes mencionados.

Cuadro 2. Respuesta de explantes de *Lysiloma sp.* a variables cualitativas.

Tratamiento	Callo	Necrosis	Porcentaje de explantes con respuesta
1	0	0	0
2	2	0	40
3	1	0	100
4	2	1	60
5	0	0	20
6	2	1	100
7	0	1	0
8	1	0	60
9	0	0	0

10	2	1	100
11	0	2	20
12	1	1	40
13	0	1	20
14	1	0	100
15	1	1	80
16	1	1	60

3: Callo o necrosis abundante; 2: callo o necrosis moderada; 1: indicios de callo o necrosis; y 0: ausencia de ambas respuestas.

Fuente: elaboración propia

CONCLUSIONES

Se logró el establecimiento exitoso de semillas de *Lysiloma sp.* en condiciones *in vitro*; y el estudio de viabilidad de la semilla demostró tener un alto porcentaje de viabilidad (casi el 100 %) y el proceso de germinación es muy rápido (24 horas), logrando germinar el 39 % en 24 horas de cultivo y el resto (99 %) en 72 horas.

Se demostró que la formación de brotes en *Lysiloma sp.* a partir de ápices vegetativos cultivados *in vitro*, está determinado por AIB (1.0 mg. L⁻¹) en presencia de BAP.

La formación de callo basal en ápices vegetativos está determinado por AIB y BAP pero en igual concentración.

REFERENCIAS

Aguilar-Jiménez, D. y Rodríguez-de-la-O, J. L. (2018b). Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave*

marmorata Roezl) en la Mixteca poblana. Colomb. Biotec. 20(2): 124-131.

Aguilar-Jiménez, D. y Rodríguez-de-la-O, J. L. (2020). Efecto de nitrato de plata en la germinación *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag. Biotecnología Vegetal 20(4): 338-350.

Arzate-Fernández, Amaury Martín, Piña-Escutia, José Luis, Norman-Mondragón, Tomás Héctor y Arroyo-Martínez, Hugo Abelardo. (2019). Apuntes de genética vegetal, México, Universidad Autónoma del Estado de México. ISBN: 978-607-633-073-9. 158 p.

Barbón, R. 2011. Embriogénesis somática de *Swietenia mahoganii* (L. Jacq.) en medios de cultivo semisólidos. Revista Forestal Baracoa 30: 124.

Bernal, J., A. Rojas, A. Hine. 2009. Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatización de vitroplantas de *Swietenia macrophylla* King (Orden:

Meliácea), *Tecnología en Marcha* 22(3): 34-41.

Carranza, P. M., Reyes M. H., Mora, S. W., Cevallos F. O., Escobar T. A., Cadme A. M., Nieto, R. J. y Morante, C. J. 2013. Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba). *Ciencia y Tecnología* 6(2): 1-8. ISSN 1390-4051 impreso; ISSN 1390-4043 electrónico.

Cecon, E., Olmsted, I. y Campo, A. J. 2002. Vegetación y propiedades del suelo en dos bosques tropicales secos de diferente estado regeneracional en Yucatán. *Agrociencia*, 36(5): 621-631.

Chávez, M., de Feria, M. 2012. Aspectos básicos de la propagación *in vitro* por organogénesis del género *Pinus*. *Biotechnología vegetal* 12(3): 131-142.

Collado, R., Barbón, R., Agramonte, D., Jiménez-Terry, F. A., Pérez, M., Gutiérrez, O. y Ramírez, D. 2004. Establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de *Swietenia macrophylla* King. *Biotechnología vegetal*, 4(3): 143-146.

Cordero, J. y D.H. Boshier. 2003. Árboles de Centroamérica un manual para extensionistas. Department of Plant Sciences University of Oxford-Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Costa Rica. 1077 p.

Daquinta, M., Ramos, L., Lezcano, Y., Rodriguez, R. y Escalona, M. 2000. Algunos elementos en la micropropagación de la teca. *Biotechnología vegetal* 1(1): 39-44.

Hartmann, H. T. y Kester D.E. (1988). Propagación de plantas: principios y prácticas. En *Propagación de plantas superiores* (591-622). México, D. F.: Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V.

Hurtado, M. D. V. y Merino, M. M. E. 2000. Cultivo de Tejidos Vegetales 5ª reimpression. Trillas S.A. de C.V., México DF; ISBN: 968-24-2159-4.

Kondamudi, R., Sri-Rma, M. K. y Pullaiah, T. 2009. Euphorbiaceae - a critical review on plant tissue culture. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10(3): 313-335.

López-Torres, J. L.; Tamarit-Urias, J. C. 2005. Crecimiento e incremento en diámetro de *Lysiloma latisiliquum* (L.) Benth. en bosques secundarios en Escárcega, Campeche, México. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 11(2): 117-123.

Luján Álvarez, Concepción, "Forestería comunitaria: una acción de base para el desarrollo forestal sustentable en México", *Relaciones. Estudios de Historia y*

Sociedad, vol. XXIV, núm. 94, Zamora, El Colegio de Michoacán, 2003, 267-283.

Mayo-Mosqueda, A., Espinosa-Moreno, J., Centurión-Hidalgo, D., Cazares-Camero, J. G. 2017. Estrategias para mejorar la germinación de semillas de *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* (Linden & H. Wendland). *Polibotánica*, 43: 1-10.

Moreno-Limón, S., González-Solís, L.N., Salcedo-Martínez, S.M., Cárdenas-Avila, M.L. y Perales-Ramírez, A. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium sp.* *POLIBOTÁNICA*, 32: 193-205. ISSN 1405-2768.

Murashige, T. y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth an bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant*. 15, 473-497.

Murillo, O., Espitia, M., Castillo, C. 2012. Fuentes semilleras para la producción forestal. Universidad de Córdoba. Ed. Damar S.A.S (Bogotá). 176 p.

Navarro, R. M.; Palacios, G. 2004. Efecto de la calidad de planta, el procedimiento de preparación y la fecha de plantación en la supervivencia de una repoblación de *Pinus pinea* L. *Cuad. Soc. Esp. Cien. For. Cuad. Soc. Esp. Cien. For.* 17: 199-204.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo 2006. ISBN: 9252055800.

Pennington, T.D. y J. Sarukhán. 2005. Árboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ecología, Fondo de Cultura Económica, México D.F., México. 523 p.