



MORFOGÉNESIS *IN VITRO* DE *Pseudotsuga menziesii* VAR. *glauca*

IN VITRO MORPHOGENESIS IN *Pseudotsuga menziesii* VAR. *glauca*

María Guadalupe Carrillo-Benítez; José Luis Rodríguez-De la O¹; José Guadalupe Álvarez-Moctezuma

Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco, km 38.5, Chapingo Estado de México, C. P. 56230.
Correo-e: jrguez@correo.chapingo.mx (¹Autor para correspondencia)

RESUMEN

Se evaluó la respuesta morfogénica a partir de embriones cigóticos cultivados *in vitro* de semilla almacenada (un año) de *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* recolectada en Tlaxcala. Las semillas fueron desinfectadas con detergente y H₂O₂ (3 % v/v) durante 48 h en agitación a 50 rpm, cultivadas en el medio de Murashige y Skoog (1962) sin reguladores. La germinación ocurrió después de siete días y posteriormente subcultivados a un medio MS con 2,4-D (3 mg·L⁻¹) y BA (1 mg·L⁻¹). Con los callos obtenidos en un medio HS se evaluaron tres concentraciones de ABA para promover formación de estructuras embrionarias, presentándose el mejor tratamiento con concentración de 10.0 mg·L⁻¹ ($P < .0001$). El mejor desarrollo de plántulas se presentó empleando un medio Murashige y Skoog (1962) con sacarosa al 6 %. Se usaron micorrizas para mejor adaptación de plántulas a suelo. No hubo formación de raíces.

Recibido: 23 de abril, 2010
Aceptado: 11 de abril, 2011
doi: 10.5154/r.chscfa.2010.04.024
<http://www.chapingo.mx/revistas>

PALABRAS CLAVE: Embrión, callo, plántula, reguladores del crecimiento.

ABSTRACT

This study assessed the morphogenic response of *in vitro* cultured zygotic embryos obtained from *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* seed collected in Tlaxcala, Mexico and stored for one year. Seeds were disinfected with detergent and H₂O₂ (3 % v/v) for 48 h under stirring at 50 rpm and cultured on Murashige and Skoog (1962) medium without regulators. Germination occurred after seven days and then the explants were subcultured on MS medium with 2,4-D (3 mg·L⁻¹) and BA (1 mg·L⁻¹). With the calluses obtained on HS medium, three ABA concentrations intended to promote formation of embryonic structures were evaluated. The best treatment was with a concentration of 10.0 mg·L⁻¹ ($P < .0001$). The best plantlet development occurred using Murashige and Skoog (1962) medium with 6% sucrose. Mycorrhizae were used to improve plantlet adaptation to soil. No roots formed.

KEY WORDS: Embryo, callus, plantlets, growth regulators.

INTRODUCCIÓN

En México, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco se localiza principalmente en el noroeste y noreste de México, además en el centro y sur aunque con poblaciones reducidas y aisladas (Domínguez, 1994; Reyes *et al.*, 2005, 2006), su importancia es ambiental (captura de carbono), económico (árboles de navidad y plantaciones especializadas), social (empleos), ecológico y forestal (especie en riesgo y distribución fitogeográfica) (Álvarez *et al.*, 2007; SEMARNAP, 2010). Mápula *et al.*, (2007) mencionan que las amenazas estriban en escasa regeneración natural y deforestación, por lo que se ubica en vías de extinción. La Norma Oficial NOM-59-SEMARNAT-2010 (D.O.F., 2010) sitúa a la especie bajo protección especial. Estas poblaciones también se ven alteradas por factores antropogénicos, como incendios, cambio de uso de suelo, corta de árboles, plagas y enfermedades (Velasco *et al.*, 2007), por ende reduce

INTRODUCTION

In Mexico, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco is found mainly in the northwest and northeast of the country, as well as in the center and south but with small and isolated populations (Domínguez, 1994; Reyes *et al.*, 2005, 2006). The Coast Douglas-fir tree is important for several reasons, including: environmental (carbon sequestration), economic (Christmas trees and specialized plantations), social (jobs), ecological and forestry-related (species at risk and phyto-geographic distribution) (Álvarez *et al.* 2007; SEMARNAP, 2010). Mápula *et al.* (2007) note that the reason the species stands in danger of extinction is because of poor natural reforestation coupled with deforestation. Official Mexican Standard NOM-59-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010) places the species under special protection. These populations are also affected by anthropogenic factors such as fire, land-use change, tree-cutting, pests and diseases (Velasco *et al.*, 2007), thus reducing its variation, increasing inbreeding

su variación, aumentando la endogamia y reduciendo capacidad reproductiva (Saccheri *et al.*, 1998; Mosseler *et al.*, 2000). En poblaciones naturales de *P. menziesii* se han detectado altos niveles de endogamia (Cruz *et al.*, 2008), escasa producción de semilla (Mápula *et al.*, 2007), problemas en la germinación y crecimiento inicial (Juárez *et al.*, 2006; Mápula *et al.*, 2008) y baja repoblación natural (Velasco *et al.*, 2007); lo cual repercute seriamente en la conservación de dicha especie (Ventura-Ríos *et al.*, 2010).

La aplicación del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, ofrece un apoyo a los métodos tradicionales de propagación, permitiendo la propagación masiva de esta especie para plantaciones comerciales de árboles de navidad, evitando la recolecta excesiva de semillas en su hábitat natural, incrementando multiplicación clonal de genotipos selectos. Además, coadyuva a crear bancos de germoplasma *in vitro*, para la conservación *ex situ*. El embrión fue utilizado con *Pinus patula* Schiede ex Schl. et Cham. var. *patula* para inducir formación de brotes (McKellar *et al.*, 1994). La calidad del embrión somático es menor que el cigótico en cuanto a morfología, peso seco, germinación y estabilidad genética (Pullman, 2003). Sin embargo, aunque se presenten ciertas limitantes, la embriogénesis somática es una técnica exitosa y potencial para la producción de diversas especies forestales (Cheng y Voqui, 1977; Arya, *et al.*, 2000). Uno de los problemas que se presenta en plántulas de coníferas obtenidas *in vitro* es la formación de raíz. El objetivo de este estudio fue evaluar las respuestas morfogénicas a partir del cultivo *in vitro* de embriones de *P. menziesii* var. *glauca*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia (Universidad Autónoma Chapingo, México). El inóculo fue semilla (un año de almacenamiento) procedente de Tlaxco, Tlaxcala. Se muestrearon 20 árboles. La semilla tuvo un peso de 119.5 mg, de 5 a 6 mm de longitud encontrándose 40 % vana y 10 % dañada por insectos. Los explantes se lavaron con detergente vigorosamente y pasaron por tratamientos de desinfestación. Para el primer tratamiento, el embrión se mantuvo en H₂O₂ (3 % v/v), durante 48 h en agitación y después se aplicó Ca(OCl)₂ al 4 % durante 15 minutos, posteriormente con H₂O₂ (3 % v/v) durante 24 horas. En agitación a 50 rpm. En el segundo tratamiento se sumergieron las semillas en fungicida (BRAVO 720) al 2 % en agua estéril durante 24 h en agitación a 50 rpm. La tercera consistió en dejar las semillas en H₂O₂ (3 % v/v) durante 48 h en agitación a 50 rpm. La cuarta prueba, se realizó a cinco plantas aplicando AGRIMYCU 500[®], quince días antes de obtener los explantes (yemas, ápices, y tallos), mismos que se lavaron con detergente al chorro del agua, y se pasaron a una solución de alcohol al 70 % durante 15 minutos, se enjuagaron en agua con antioxidante (100 mg·L⁻¹ de ácido

and reducing reproductive capacity (Saccheri *et al.*, 1998; Mosseler *et al.*, 2000). In *P. menziesii* natural populations, high levels of inbreeding (Cruz *et al.*, 2008), low seed production (Mápula *et al.*, 2007), problems during germination and early growth (Juárez *et al.* 2006; Mápula *et al.*, 2008) and low natural recruitment (Velasco *et al.*, 2007) have been detected. All these factors have serious repercussions on the conservation of this species (Ventura-Ríos *et al.*, 2010).

In vitro culturing of plant cells and tissues provides support for traditional propagation methods, allowing the mass propagation of this species for commercial Christmas tree plantations, thereby avoiding the excessive harvesting of seeds in its natural habitat and increasing clonal multiplication of selected genotypes. It also helps to create *in vitro* germplasm banks for *ex situ* conservation. The embryo was used with *Pinus patula* Schiede ex Schl. et Cham. var. *patula* to induce shoot formation (McKellar *et al.*, 1994). The quality of somatic embryos is lower than that of zygotic ones in morphology, dry weight, germination and genetic stability (Pullman, 2003). However, although it has certain limitations, somatic embryogenesis is a successful technique with potential for the production of various forest species (Cheng and Voqui 1977; Arya *et al.*, 2000). One problem that occurs in conifer plantlets obtained *in vitro* is root formation. The aim of this study was to assess morphogenic responses from *in vitro* culturing of *P. menziesii* var. *glauca* embryos.

MATERIALS AND METHODS

This work was performed at the Plant Tissue Culture Laboratory operated by the Plant Science Dept. at the Universidad Autónoma Chapingo, Mexico. The inoculum was seed (one-year storage) from Tlaxco, Tlaxcala. In total, 20 trees were sampled. On average, each seed weighed 119.5 mg and measured 5 to 6 mm in length; 40 % of the seeds were found empty and 10 % damaged by insects. The explants were washed thoroughly with detergent and underwent disinfestation treatments. For the first treatment, the embryo was kept in H₂O₂ (3 % v/v) for 48 h with stirring and then 4 % Ca (OCl)₂ was applied for 15 minutes, followed by H₂O₂ (3 % v/v) for 24 hours with stirring at 50 rpm. In the second treatment, the seeds were dipped in 2 % fungicide (BRAVO 72) in sterile water for 24 h under stirring at 50 rpm. The third treatment was to leave the seeds in H₂O₂ (3 % v/v) for 48 h under stirring at 50 rpm. In the fourth test, AGRIMYCU 500[®] was applied to five plants fifteen days before obtaining the explants (buds, shoots and stems), which were washed with detergent under running tap water and then transferred to a 70 % alcohol solution for 15 minutes. They were rinsed in water with antioxidant (100 mg·L⁻¹ ascorbic acid plus 150 mg·L⁻¹ citric acid) to control necrosis. Subsequently, they were transferred to a 6 % commercial bleach solution for 5 minutes and then

ascórbico más $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido cítrico), para controlar el necrosamiento, posteriormente, se pasaron a una solución de cloro comercial al 6 % durante 5 minutos, enjuagándose con agua más antioxidantes, los explantes permanecieron en ésta hasta el momento de ser cultivados.

En la primera prueba se utilizaron las semillas desinfectadas con el fungicida (BRAVO 720), las que fueron colocadas en cajas Petri, con papel filtro húmedo, en cámaras de germinación a 20 y 30 °C, con 16 horas luz y 8 horas de oscuridad durante dos meses. En la segunda prueba de germinación se utilizaron las semillas desinfectadas con $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ y H_2O_2 , (3 % v/v), las que fueron cultivadas en medio nutritivo Murashige y Skoog (1962) al 100 %. Mientras que en la tercer prueba se utilizaron las semillas colocadas en el H_2O_2 (3 % v/v), mismas que se disectaron para extraer el embrión. El medio básico utilizado en las pruebas de germinación fue el de MS, al 100 %, sin reguladores de crecimiento, con Tiamina. Para inducir la formación de callos se utilizó el medio de Murashige y Skoog (1962) en dos tratamientos; en el primero se disminuyeron nitratos al 50 % y se aumentaron fosfatos al 200 %, con L-glutamina ($450 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Caseína hidrolizada ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Benciladenina (BA). Para el segundo se utilizó las sales básicas del medio Murashige y Skoog (1962) y se adicióno L-glutamina ($450 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 1.5 % de malta, más $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de KIN y $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ABA.

El medio utilizado para inducir crecimiento de callos fue el de Schenk y Hildebrandt (1972) con carbón activado al 0.1 %, con concentraciones de 0.0, 0.5, 1.0 y $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, y con 0.0, 0.5, 1.0 y $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cinetina. Para la inducción de embriones se utilizó como medio básico el de HS (1972), más carbón activado al 0.1 %, 0.0 y $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, 0.0 y $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cinetina y 0.0, 10.0, 20.0 y $40.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido abscísico. El medio utilizado para inducir la organogénesis fue el medio básico el de MS, con carbón activado ($50\text{-}100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), maltosa al 1.5 %, $450 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-glutamina, $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido naftalenacético, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cinetina. El medio usado para desarrollar plántulas fue el medio básico el de MS, con vitaminas WS (Aguilar, 1997), y carbón activado; al primer tratamiento se le adicionó azúcar al 3 y 6 %, y al segundo sacarosa al 3 y 6 %, como fuente de carbohidratos. Las semillas, embriones, callos, ápices, yemas, tallos y plántulas se mantuvieron a $27 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante el día y de $23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ en la noche, con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. La incubación de embriones, callos, yemas, ápices y tallos, se mantuvo con una intensidad luminosa de $17 \text{ }\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, y las plántulas a $29 \text{ }\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, la iluminación fue proporcionada por lámparas fluorescentes DURO-TEST (Labline®.Mexico de 75 W). Para semillas y embriones se utilizó la incubadora Lab-Line IMPERIAL®, bajo oscuridad.

rinsed with water plus antioxidants; the explants remained in it until culturing.

The first test used the seeds disinfected with fungicide (Bravo 720), which were placed in Petri dishes with moist filter paper, and then in germination chambers at 20 and 30 °C, with 16 hours light and 8 hours of darkness for two months. In the second germination test, the seeds disinfected with $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ and H_2O_2 (3 % v/v) were cultured on 100 % Murashige and Skoog (1992) nutrient solution, while in the third test, the seeds placed in H_2O_2 (3 % v/v) were dissected to remove the embryo. The basal medium used in the germination tests was 100 % MS, without growth regulators, with thiamine. To induce callus formation, Murashige and Skoog (1962) medium was used in two treatments. In the first, nitrates were decreased to 50 % and phosphates increased to 200 %, with L-glutamine ($450 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), hydrolyzed casein ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D and $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ benzyladenine (BA). For the second, Murashige and Skoog (1962) basal salt medium was used, adding L-glutamine ($450 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and 1.5 % maltose, plus $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KIN and $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA.

To induce callus growth, Schenk and Hildebrandt (1972) medium with 0.1 % activated charcoal was used, with concentrations of 0.0, 0.5, 1.0 and $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, and 0.0, 0.5, 1.0 and $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kinetin. For inducing embryos, the basal medium used was HS (1972), plus 0.1 % activated charcoal, 0.0 and $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, 0.0 and $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kinetin and 0.0, 10.0, 20.0 and $40.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ abscisic acid. The medium used to induce organogenesis was MS basal medium, with activated charcoal ($50\text{-}100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 1.5 % maltose, $450 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ L-glutamine, $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ naphthaleneacetic acid, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kinetin. The medium used to develop plantlets was MS basal medium, with WS vitamins (Aguilar, 1997) and activated charcoal. In the first treatment, 3 and 6 % sugar were added; in the second, 3 and 6 % sucrose were added as a source of carbohydrates. The seeds, embryos, calluses, shoot apices, buds, stems, and plantlets were kept at $27 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ during the day and $23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ at night, with a photoperiod of 16 hours light and 8 hours darkness. Incubation of embryos, calluses, buds, shoot apices and stems was maintained with a light intensity of $17 \text{ }\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, while for the plantlets it was $29 \text{ }\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. The lighting was provided by DURO-TEST florescent lights (Labline® Mexico, 75 W). For seeds and embryos, a Lab-Line IMPERIAL® incubator was used under darkness.

For the seeds in the germination chambers, contamination percentage and number of seeds germinated were assessed. The observation period was two months. For the evaluation of seed germination on Murashige and Skoog (1962) medium, variables evaluated were contamination and germination percentage, under conditions of light and darkness for seven days. Subsequently, the contamination

Para las semillas en las cámaras germinadoras, se evaluaron porcentaje de contaminación y número de semillas germinadas, el tiempo de observación fue de dos meses. Para la evaluación de la germinación de semillas en medio Murashige y Skoog (1962), las variables evaluadas fueron porcentaje de contaminación y de germinación, en condiciones de luz y oscuridad durante siete días. Posteriormente se evaluó porcentaje de contaminación en el medio MS en 3, 4 y 13 días. Se evaluaron los embriones que formaron callo y porcentaje de necrosamiento a los 20 días después de la siembra. Se evaluó el porcentaje de contaminación, necrosamiento, a los 5, 12, 19, y 26 días en las yemas, ápices y tallos con una y dos hojas, cultivados *in vitro*. Para la evaluación de los callos en respuesta al medio HS (1972) con benciladenina (BA) y cinetina (KIN) se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar, los datos se presentan a los nueve y 17 días; el diseño consta de dos bloques; cuatro tratamientos y siete repeticiones, la variable respuesta fue el diámetro por callo. Para el análisis estadístico se consideraron tres tratamientos en medio HS con 0.5, 1.0. y 3.0 mg·L⁻¹ de BA y 0.5, 1.0. y 3.0 mg·L⁻¹ de KIN.

Para la evaluación de recuperación de callos del medio HS con BA y KIN se evaluó el diámetro de los callos proveniente de cada tratamiento incluyendo al testigo. Se utilizó un diseño completamente al azar, se consideraron cuatro tratamientos, se tuvieron cuatro repeticiones para el testigo, cinco para el tratamiento uno, dos para el tratamiento dos y cinco para el tratamiento tres. El periodo de cultivo fue de cuatro semanas. Para la evaluación del crecimiento de callos y formación de embriones en medio HS con ABA se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar. Los datos se tomaron en la primera, segunda, tercera y cuarta semana. El diseño constó de cuatro bloques; cuatro tratamientos y cuatro repeticiones. Los tratamientos tuvieron concentraciones de 0.0, 10.0 20.0 y 40.0 mg·L⁻¹ de ABA más 0.5 mg·L⁻¹ de BA y 0.5 mg·L⁻¹ de KIN. Se evaluó el diámetro de callos y formaciones globulares (embriones).

Para determinar la mejor combinación de reguladores de crecimiento se uso un análisis de varianza. Para evaluar el diámetro de los callos se utilizó un diseño completamente al azar, que constó de cuatro tratamientos con cuatro repeticiones por tratamiento. El período de cultivo fue de cuatro semanas. Para las pruebas con azúcar y sacarosa, se registraron el número de hojas, altura y necrosamiento de plántulas, durante 56 días. Las plántulas se trasplantaron para su aclimatación, se observaron durante 29 días (estuvieron dentro de la bolsa 15 días), evaluando supervivencia y formación de hojas. El análisis estadístico se realizó en el paquete SAS (1999) ($P \leq 0.05$).

El sustrato para el trasplante a suelo fue una mezcla de peatmoss, perlita y vermiculita (52, 23 y 25 %) más 40 mg de MycorTree™ Ecto-Inyectable™ (*Pisolithus*

percentage on MS medium was assessed at 3, 4 and 13 days. Embryos that formed callus and necrosis percentage were assessed at 20 days after sowing. Contamination and necrosis percentage were determined at 5, 12, 19, and 26 days in buds, shoot apices and stems with one or two leaves, grown *in vitro*. To evaluate callus response to the HS (1972) medium with benzyladenine (BA) and kinetin (KIN), a completely randomized block design was used for the experiment. The data are presented at nine and 17 days. The design consists of two blocks, four treatments and seven replications, with callus diameter as the response variable. The statistical analysis included three HS medium treatments with 0.5, 1.0 and 3.0 mg·L⁻¹ BA, and 0.5, 1.0 and 3.0 mg·L⁻¹ KIN.

To evaluate callus recovery on the HS medium with BA and KIN, the diameter of the calluses from each treatment, including the control, was assessed. A completely randomized design was used, with four treatments considered. There were four replications for the control, five for treatment one, two for treatment two and five for treatment three. The culture period was four weeks. To evaluate callus growth and embryo formation on HS medium with ABA, a completely randomized block design was used. Data were taken in the first, second, third and fourth week. The design consisted of four blocks, four treatments and four replications. Treatments were with concentrations of 0.0, 10.0, 20.0 and 40.0 mg·L⁻¹ ABA plus 0.5 mg·L⁻¹ BA and 0.5 mg·L⁻¹ KIN. Callus diameter and globular formations (embryos) were evaluated.

To determine the best combination of growth regulators, an analysis of variance was used. To evaluate callus diameter, a completely randomized design, consisting of four treatments with four replications per treatment, was used. The culture period was four weeks. For the tests with sugar and sucrose, leaf number, plantlet height and necrotic percentage were recorded over 56 days. Plantlets were transplanted for acclimatization and observed for 29 days (they were in the bag 15 days), assessing survival and leaf formation. Statistical analysis was performed with SAS software (1999) ($P \leq 0.05$).

The substrate for transplanting to soil was a mixture of peatmoss, perlite and vermiculite (52, 23 and 25 %) plus 40 mg of MycorTree™ Ecto-Inyectable™ (*Pisolithus tinctorius* and *Scleroderma*). Plantlets were dipped in a 20-ml solution with 25 mg of T-22™ PHC™ (*Trichoderma harzianum*). They were then transplanted in tubets with the moist substrate and protected with a bag for 15 days to maintain relative humidity, which was gradually decreased until the plantlets bore the environmental humidity, and they were exposed to a light intensity of 61 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and a temperature of 29 and 21 °C. A week after being transplanted, they were fertilized with inorganic salts of the Murashige and Skoog (1962) medium at 50%.

tinctorius y *Scleroderma*). Las plántulas se sumergieron en una solución de 20 ml con 25 mg de T-22™ PHC™ (*Trichoderma harzianum*). Posteriormente se trasplantaron en tubetes con el sustrato humedecido, y protegidos con una bolsa durante 15 días, para mantener la humedad relativa, misma que se fue disminuyendo gradualmente, hasta que las plántulas soportaron la humedad ambiental, expuestas a una intensidad luminosa de $61 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y una temperatura de 29 y 21 °C. Una semana después de ser trasplantadas fueron fertilizadas con sales inorgánicas del medio Murashige y Skoog (1962) al 50 %.

El modelo estadístico utilizado fue completamente al azar (DCA):

$$Y_{(ij)} = \mu + t_{(i)} + e_{j(i)}$$

Donde:

Y: es la variable de respuesta de interés,

μ : es el promedio general de la muestra sobre la cual se está trabajando,

t: es la variación que se atribuye a los niveles del factor que se está evaluando (efecto de los tratamientos),

e: es la variación de los factores no controlados (el error experimental),

i: es el i-ésimo tratamiento,

j: es la j-ésima repetición de cada tratamientos,

j(i): es la variación de las unidades experimentales anidada en los tratamientos.

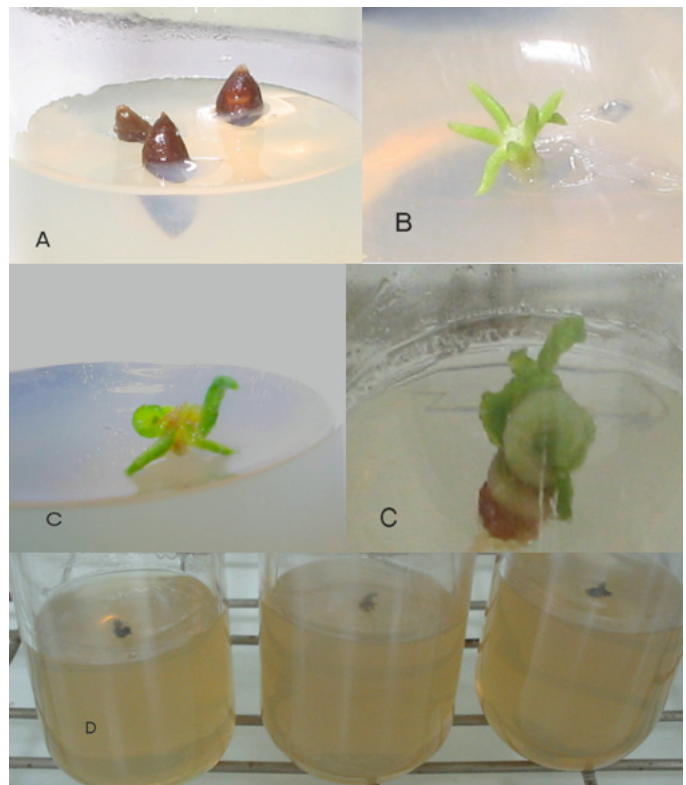


FIGURA 1. A) Semillas en MS. B) Embrión en MS sin reguladores (13 d). C) Formación de callos (tratamiento E1) (2 d). D) Embriones (tratamiento E2) (8 d).

FIGURE 1. A) Seeds on MS. B) Embryo on MS without regulators (13 d). C) Callus formation (treatment E1) (2 d). D) Embryos (treatment E2) (8 d).

The statistical model used was completely randomized (DCA):

$$Y_{(ij)} = \mu + t_{(i)} + e_{j(i)}$$

Where:

Y: is the response variable of interest,

μ : is the overall average of the sample being worked on,

t: is the variation attributed to the factor levels being evaluated (treatment effect),

e: is the variation in the uncontrolled factors (experimental error),

i: is the ith treatment,

j: is the jth replication of each treatment,

j(i): is the variation in the experimental units nested in the treatments.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando los embriones fueron cultivados en el medio Murashige y Skoog (1962), sin reguladores y H_2O_2 hubo 27.8 % de contaminación a los tres días (por bacterias), la respuesta al medio fue de 44.4 % a los 13 días y el 27.8 % no respondieron. Monjarás (2004), menciona que en el proceso de desinfección utilizó bactericidas y fungicidas. El H_2O_2 desinfectó efectivamente las semillas, sin embargo, la respuesta que tuvieron los embriones al medio de cultivo, no fue positiva. Los embriones maduros de *Picea chihuahuana* Martínez (López-Escamilla *et al.*, 2000) y *Pseudotsuga menziesii* (Galindo, 2000; Monjarás, 2004) forman brotes adventicios cuando se cultivan en medios con reguladores de crecimiento. En este trabajo, el medio MS sin reguladores promovió una germinación más rápida de los embriones (Figura 1).

En el tratamiento donde los nitratos se disminuyeron y bajo condiciones de luz, los embriones respondieron

formando callos a los 20 días (Figura 1). Sin embargo, Tang *et al.* (2001a) mencionan que en *Pinus taeda* L. tardan nueve semanas en formar callos usando el mismo medio, y en el tratamiento con malta, en condiciones de luz y oscuridad, no respondieron necrosándose a los ocho días. Lo que tal vez se deba a la edad del embrión y a actividad de reguladores en el medio (Figura 1). Murashige y Nakano (1986) y Latkoska *et al.* (2000), mencionan que la luz y genotipo tienen gran influencia en el crecimiento del tejido embrionario. En nuestro estudio los callos fueron subcultivados en medio MS con 2,4-D, BA y KIN, manteniendo un color verde durante 14 días, necrosándose totalmente a los 19 días. Conger (1984) señala que una concentración no adecuada de carbón activado en el medio puede inhibir embriogénesis. En esta prueba los explantes no respondieron al medio de cultivo, el necrosamiento se presentó a los cinco días después de ser cultivados, con 56.5 % de necrosamiento total a los 26 días (Figura 2) y una contaminación total de 43.5 %, por presencia de hongos. McCown (1988) dice que la oxidación se da por una inadecuada concentración de sales, y reportó que los medios contienen bajos niveles de nitratos, que los que se encuentran en el medio MS.

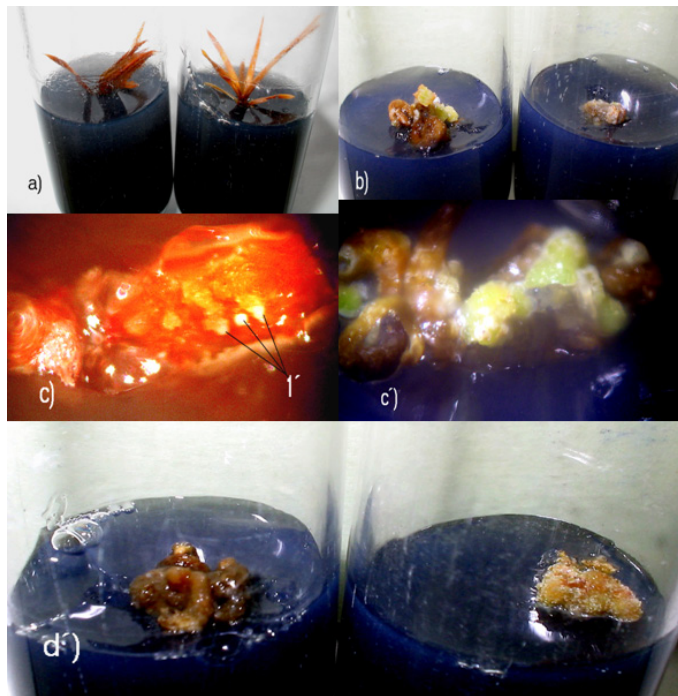


FIGURA 2. a) Explantes necrosados (26 d). b) Callos en HS (.5 y 3.0 mg·L⁻¹ de BA y KIN) (17 d). c) Estructuras embriogénicas en HS (.5 mg·L⁻¹ de KIN, BA y 10 mg·L⁻¹ de AB) (28 d). d) Recuperación de callos en HS (.5 mg·L⁻¹ de BA y KIN) (17 d).

FIGURE 2. a) Necrotic explants (26 d). b) Calluses on HS (.5 and 3.0 mg·L⁻¹ BA and KIN) (17 d). c) Embryogenic structures on HS (.5 mg·L⁻¹ KIN, BA and 10 mg·L⁻¹ AB) (28 d). d) Callus recovery on HS (.5 mg·L⁻¹ BA and KIN) (17 d).

No hubo diferencias significativas entre las concentraciones de BA y KIN ($Pr > F = 0.1528$) ni ABA ($Pr > F = 0.1781$), en el aumento del diámetro de los callos.

RESULTS AND DISCUSSION

When embryos were grown on Murashige and Skoog (1962) medium, without regulators and H₂O₂, there was 27.8 % contamination at three days (by bacteria). The response to the medium was 44 % at 13 days and 27.8 % did not respond. Monjarás (2004) mentions that in the disinfection process, he used bactericides and fungicides. H₂O₂ effectively disinfected the seeds; however, the response of the embryos to the medium was not positive. Mature embryos of *Picea chihuahuana* Martínez (López-Escamilla *et al.*, 2000) and *Pseudotsuga menziesii* (Galindo, 2000; Monjarás, 2004) formed adventitious shoots when cultured on media with growth regulators. In this study, the MS medium without regulators promoted faster embryo germination (Figure 1).

In the treatment with decreased nitrates and low light conditions, the embryos responded by forming calluses at 20 days (Figure 1). However, Tang *et al.* (2001a) mention that in *Pinus taeda* L., embryos take nine weeks to form calluses using the same medium, and in the treatment with maltose under conditions of light and darkness, they did not respond to the treatment, becoming necrotic at eight days, which is perhaps due to the age of the embryo and regulatory activity in the medium (Figure 1). Murashige and Nakano (1986) and Latkoska *et al.* (2000) mention that light and genotype strongly influence the growth of embryonic tissue. In our study, calluses were subcultured on MS medium with 2,4-D, BA and KIN, maintaining a green color for 14 days and becoming completely necrotic at 19 days. Conger (1984) suggests that an inadequate concentration of activated charcoal in the medium can inhibit embryogenesis. In this test, the explants did not respond to the culture medium. Necrosis appeared at five days after being cultured, with 56.5 % undergoing total necrosis at 26 days (Figure 2) and 43.5 % total contamination, due to the presence of fungi. McCown (1988) states that oxidation occurs due to an inadequate concentration of salts and reported that the media contain low nitrate levels, which are found in MS medium.

There were no significant differences between the concentrations of BA and KIN ($Pr > F = 0.1528$) or ABA ($Pr > F = 0.1781$) in increasing callus diameter. Necrosis appeared at 17 days (Figure 2). Salajova *et al.* (1996) reported that in hybrids of *Abies alba* Mill. x *Abies cephalonica* Loud. and of *Abies alba* x *Abies numidica* Lannoy ex Carrière cultured with 1 mg·L⁻¹ BAP, there was greater callous formation and growth. The calluses grown were limited by the 2,4-D activity, as well as the necrosis. Tang (2001b) mentions that in *Pinus taeda*, growth of embryogenic mass reached 17 % on 50 % MS basal medium with 2,4-D and BA (Figure 2). To recover the calluses undergoing necrosis, they were subcultured on the best treatment from the previous experiment, which was 0.5 mg·L⁻¹ BA and 0.5 mg·L⁻¹ KIN, for

El necrosamiento se presentó a los 17 días (Figura 2). Salajova *et al.* (1996) reportaron en híbridos de *Abies alba* Mill. x *Abies cephalonica* Loud. y de *Abies alba* x *Abies numidica* Lannoy ex Carrière cultivados con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP, que fue mayor para formación y crecimiento de callos. Los callos crecidos fueron limitados por actividad del 2,4-D, aunado a necrosamiento. Tang (2001b) menciona que en *Pinus taeda*, el crecimiento de masa embriogénica llegó a 17 % en medio básico MS al 50 % con 2,4-D y BA. (Figura 2). Para recuperar los callos del necrosamiento se subcultivaron en el mejor tratamiento del experimento anterior el cual fue $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de KIN, durante cuatro semanas. Con base en el análisis de varianza se encontró que al menos uno de los tratamientos se recuperó ($P=0.0289$), los diámetros de los callos presentaron diferencias significativas, al disminuir la concentración de BA y KIN. Al adicionar carbón activado al medio se absorben los fenoles y se retarda el necrosamiento (Figura 2).

Para la inducción de tallos (en gimnospermas o angiospermas) se utiliza comúnmente BA en sales Murashige y Skoog (1962) o medio de cultivo para leñosas (WPM), adicionado con calcio (por ejemplo en *Pinus pinaster* Ait. y *Betula platyphylla* Sukaczew (Debergh y Zimmerman, 1993). Sin embargo, el uso de sales minerales para gimnospermas, las cuales son muy variables y usualmente contienen bajos niveles de nitratos (Arya *et al.*, 2000), como aquellos encontrados en las sales MS y WPM, sumado a las condiciones ambientales requeridas por la planta. Con base en el análisis de varianza (SAS, 1999) se encontró que al menos un tratamiento tuvo efecto sobre la formación de embriones en los callos ($P<0.0001$). El mejor efecto en la formación de embriones fue la concentración de $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ABA ($P=0.05$) (Figura 2). Salajova *et al.* (1996) reportaron que el potencial embriogénico de los callos en *Abies alba* x *A. cephalonica* y *A. alba* x *A. numidica* depende del medio de cultivo y del tipo de explante. Monjarás (2004) señaló que en embriones maduros disectados de *Pseudotsuga*, cultivados en medio SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) con ANA (Ácido Naftalen Acético)/BA (6-Bencil Adenina) o 2,4-D (ÁCIDO 2-4 (Diclorofenoxiacético)/ K (Cinetina)) en diferentes concentraciones se forman brotes adventicios, y los embriones cigóticos cultivados, comienzan a formar otros embriones entre la cuarta y sexta semana, sin embargo destaca el problema para inducir el enraizamiento de brotes. Tang (2001b) reportó que la inducción de la organogénesis somática directa en *P. taeda*, resultó de la formación de múltiples tallos inducidos en cotiledones e hipocotilo de embriones cigóticos maduros, en un medio con 2,4-D, ANA, BA y KIN, durante 2 y 3 semanas. Sin embargo, otras hormonas llamadas Brasinosteroides (Brasinolide) tienen un impacto en la inducción de la embriogénesis somática de *Pinus taeda*, *Pseudotsuga menziesii* y *Picea abies* (L.) Kars., afectando la elongación celular y la producción de etileno, y aumentando la resistencia al estrés abiótico y

four weeks. Based on the analysis of variance, it was found that at least one of the treatments recovered ($P= 0.0289$). Callus diameters differed significantly by decreasing the concentration of BA and KIN. By adding activated charcoal to the medium, phenols are absorbed and necrosis slowed (Figure 2).

For stem induction (in gymnosperms or angiosperms), BA in Murashige and Skoog (1962) basal salt medium or woody plant medium (WPM), supplemented with calcium supplement, is commonly used (e.g., in *Pinus pinaster* Ait. and *Betula platyphylla* Sukaczew (Debergh and Zimmerman, 1993). However, the use of mineral salts for gymnosperms, which are very variable and usually contain low nitrate levels (Arya *et al.*, 2000) like those found in MS salts and WPM, added to the environmental conditions required by the plant. Based on the analysis of variance (SAS, 1999), it was found that at least one treatment had an effect on embryo formation in calluses ($P<0.0001$). The best effect on embryo formation occurred with the concentration of $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA ($P=0.05$) (Figure 2). Salajova *et al.* (1996) reported that the embryogenic potential of calluses in *Abies alba* x *A. cephalonica* and *A. alba* x *A. numidica* depends on the culture medium and the type of explant. Monjarás (2004) notes that in mature embryos dissected from *Pseudotsuga* and cultured on SH medium (Schenk and Hildebrandt, 1972) with NAA (naphthalene acetic acid)/BA (6-benzyl adenine) or 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) at different concentrations, adventitious shoots form, and the cultured zygotic embryos begin to form embryos between the fourth and sixth week. However, it highlights the problem of inducing shoot rooting. Tang (2001b) reported that induction of direct somatic organogenesis in *P. taeda* resulted from the formation of multiple shoots induced in cotyledons and hypocotyl of mature zygotic embryos on a medium with 2,4-D, NAA, BA and KIN for 2 to 3 weeks. However, other hormones called brassinosteroids (brasinolide) have an impact on the induction of somatic embryogenesis in *Pinus taeda*, *Pseudotsuga menziesii* and *Picea abies* (L.) Kars., affecting cell elongation and ethylene production and increasing resistance to abiotic stress and the weight of embryogenic tissue (Pullman, 2003). Arya *et al.* (2000) mention that calluses can be obtained from *P. roxburghii* Sarg. zygotic embryos at different development stages, on DCR medium with 2,4-D, NAA and BA. Tang *et al.* (2001a) mention that in the regeneration of plantlets from *P. taeda* zygotic embryos cultured in eight different formulations of basal salts with 2,4-D, BA, hydrolyzed casein and L-glutamine, in a period of nine weeks, embryogenic tissue and calluses are formed. They further reported that the highest formation of embryogenic tissue was 17 % in 50 % MS basal medium, and that the embryos formed **over** a period of 4-12 weeks.

The embryos cultured in Murashige and Skoog (1962) medium with WS vitamins (Aguilar, 1997) plus 6% sugar formed three plantlets, which became necrotic after

el peso del tejido embriogénico (Pullman, 2003). Arya *et al.* (2000), mencionan que se pueden obtener callos de embriones cigóticos de *P. roxburghii* Sarg., con diferentes etapas de desarrollo, en medio DCR con 2,4-D, ANA, y BA. Tang *et al.* (2001a), mencionan que la regeneración de plántulas a partir de embriones cigóticos de *P. taeda* cultivados en ocho formulaciones diferentes de sales básicas, con 2,4-D, BA, caseína hidrolizada y L-glutamina, en un periodo de nueve semanas, se forman tejido embriogénico y callos y reportó que la más alta formación de tejido embriogénico fue de un 17 % en medio básico de MS al 50 %, y los embriones en un periodo de 4-12 semanas.

Los embriones cultivados en Murashige y Skoog (1962) con vitaminas WS (Aguilar, 1997) más Azúcar al 6 % formaron tres plántulas, las cuales se necrosaron a partir de los 21 días, mientras que embriones cultivados con azúcar al 3 %, formaron tres plántulas (de 200 semillas), necrosándose una a los 10 días. Los embriones cultivados en medio nutritivo MS con vitaminas WS más sacarosa al 6 %, formaron tres plántulas (de 200 semillas), el necrosamiento se presentó en una plántula a los 14 días y los embriones cultivados en el mismo medio más sacarosa al 3%, formaron dos plántulas, el necrosamiento se presentó en una plántula a partir de los 14 días. Las plántulas obtenidas *in vitro* no desarrollaron raíz (Figura 3). Existen reportes de mínima formación de raíz en brotes de *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. con un medio libre de hormonas y las plántulas en un sustrato con turba y perlita, tuvieron un 20 % de formación de raíces. En *Pseudotsuga menziesii* el crecimiento de tallos adventicios fue estimulado por un medio de cultivo de baja concentración de sales inorgánicas sin adición de reguladores de crecimiento (Cheng, 1975). En las plántulas provenientes de los tratamientos con azúcar al 3 % y sacarosa al 3 % que se transfirieron al sustrato, la supervivencia fue nula a los 25 días, sobreviviendo una plántula a los 29 días cumplidos proveniente del tratamiento con sacarosa al 6 %, ésta formó raíz con la ayuda de hongos ectomicorrízicos (AGROTERRA), aunque su crecimiento fue muy lento. Agregar hongos micorrízicos al sustrato permitió la formación de raíz y la supervivencia. Li *et al.* (2006) mencionan que las raíces micorrizadas tienen mayor capacidad para absorber nutrientes del suelo, multiramificación, y el crecimiento de las hifas dentro del suelo incrementan la absorción de agua y nutrientes.

CONCLUSIONES

La mejor prueba de germinación fue cultivar los embriones en medio básico Murashige y Skoog (1962) al 100 %, sin reguladores de crecimiento. El medio MS promovió la formación de callos (modificando las cantidades de nitratos, fosfatos y adicionando L-glutamina y caseína hidrolizada). Se recomienda disminuir los niveles de nitratos en el medio y utilizar otro inhibidor de

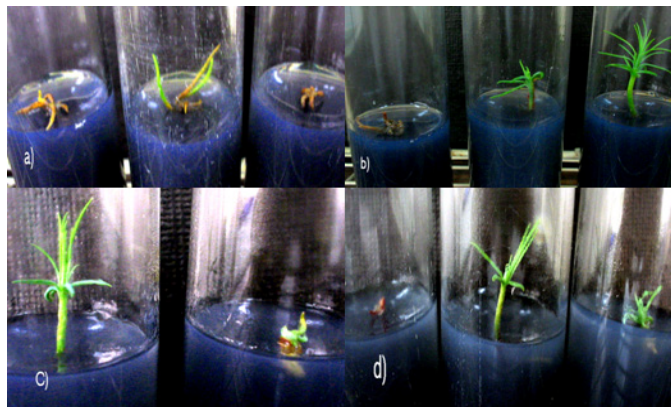


FIGURA 3. Plántulas en medio con: a) azúcar al 6 % (21 d); b), azúcar al 3 % (28 d), c) sacarosa al 3 % (21 d) y d) sacarosa al 6 % (21 d).

FIGURE 3. Plantlets in medium with: a) 6% sugar (21 d); b), 3 % sugar (28 d); c) 3% sucrose (21 d); d) 6% sucrose (21 d).

21 days, while embryos cultured with 3% sugar formed three plantlets (from 200 seeds), with one becoming necrotic at ten days. The embryos cultured in MS nutrient medium with WS vitamins plus 6 % sucrose formed three plantlets (from 200 seeds), with necrosis appearing in one plantlet at 14 days, while the embryos cultured in the same medium plus 3 % sucrose formed two plantlets, with necrosis appearing in one plantlet at 14 days. The plantlets obtained *in vitro* did not develop roots (Figure 3). There are reports of minimal root formation in *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. shoots with a hormone-free medium and the plantlets in a substrate with peat and perlite; they had 20 % root formation. In *Pseudotsuga menziesii*, growth of adventitious shoots was stimulated by a culture medium with low concentrations of inorganic salts without growth regulators added (Cheng, 1975). In the plantlets from treatments with 3 % sugar and 3 % sucrose that were transferred to substrate, survival was zero at 25 days. One plantlet from the treatment with 6 % sucrose survived to 29 days, forming a root with the help of ectomycorrhizal fungi (AGROTERRA), although its growth was very slow. Adding mycorrhizal fungi to the substrate allowed root formation and survival. Li *et al.* (2006) mention that mycorrhizal roots have a greater capacity to absorb soil nutrients, and that multi-branching and hyphae growth within the soil increase water and nutrient absorption.

CONCLUSIONS

The best germination treatment was to culture the embryos on 100 % Murashige and Skoog (1962) basal medium, without growth regulators. The MS medium promoted callus formation (by changing the amounts of nitrates and phosphates and adding L-glutamine and hydrolyzed casein). We recommend decreasing the nitrate levels in the medium and using another oxidation inhibitor different from activated charcoal to reduce oxidation levels. The best response for forming embryogenic structures was

la oxidación diferente al carbón activado para reducir los niveles de oxidación. La mejor respuesta para la formación de estructuras embriogénicas, fue en el medio Hildebrandt y Schenk. con 10.0 mg·L⁻¹ de ABA. El mejor tratamiento para desarrollar plántulas fue en medio MS con vitaminas WS y azúcar al 3 %, y para desarrollar plántulas más resistentes para ser aclimatadas fue en medio MS con vitaminas WS y sacarosa al 6%. No se obtuvieron raíces a pesar de que se dio el tratamiento con auxinas. En la última etapa, durante la transferencia a suelo, las raíces se pudieron promover gracias a la adición de hongos ectomicorrízicos (AGROTERRA).

in the Schenk and Hildebrandt medium with 10.0 mg·L⁻¹ ABA. The best treatment for developing plantlets was in the MS medium with WS vitamins and 3 % sugar, while the best one for developing plantlets that are more resistant to climate change was the MS medium with WS vitamins and 6% sucrose. No roots were obtained even though auxin treatment was applied. In the final stage, during the transfer to soil, it was possible to promote roots with the addition of ectomycorrhizal fungi (AGROTERRA).

End of English Version

LITERATURA CITADA

- AGUILAR D. N. 1997. Efecto de citocininas en organogénesis y desarrollo de vainilla (*Vainilla planifolia* A.) *in vitro*. Tesis Profesional. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Méx. 40 p.
- ÁLVAREZ M., J. G.; I. ALIA T.; M. T. COLINAS L.; J. SAHAGÚN C. 2007. Interspecific Differences in Postharvest Quality on Mexican Christmas Trees. *Silvae Genetica* 56, 2: 65-73.
- ARYA, S.; KALIA, R. K.; ARYA, I. D. 2000. Induction of somatic embryogenesis in *Pinus roxburghii* Sar. *Plant Cell Reports*. 19(8): 775-780. AHUJA, M. 1996. Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Acad.Publ. lugar? 365 p.
- CHENG, T. Y. 1975. Adventitious bud formation in culture of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (MIRB.) Franco). *Plant Science Letters* 5 (2): 97-102.
- CHENG, T. Y.; VOQUI, T. H. 1977. Regeneration of Douglas-fir plantlets through tissue culture. *Science* 306:307.
- CONGER, B. V. 1984. Cloning Agriculture Plants via *in vitro*. Techniques University of Tennessee. Boca Raton, USA. 273 p.
- CRUZ N. J.; VARGAS H. J. J.; RAMÍREZ V. P.; LÓPEZ U. J. 2008. Patrón de cruzamiento en poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, en México. *Agrociencia* 42: 367-378.
- DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. 1993. Micropropagation, Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherland. 484 p.
- D.O.F. 2010. Diario Oficial de la Federación. Secretaría de Desarrollo Social. 1a sección. México, D.F. 488(10): 23.
- DOMÍNGUEZ, F. A. 1994. Análisis histórico-ecológico de los bosques de *Pseudotsuga* en México. INIFAP-CIR Golfo Centro. Méx. 23: 43.
- GALINDO F., G. L. 2000. Regeneración *in vitro* de *Pseudotsuga macrolepis* Flous. a partir de embriones maduros. SIZA-CONACYT. 1-9.
- JUÁREZ A., A.; LÓPEZ U. J.; VARGAS H., J. J.; SÁENZ R. C. 2006. Variación geográfica en la germinación y crecimiento inicial de plántulas de *Pseudotsuga menziesii* de México. *Agrociencia* 40: 783-792.
- LATKOSKA, M. J.; KVAALLEN H.; APPELGREN, M. 2000. Genotype dependent blue and red light inhibition of the proliferation of the embryogenic tissue of Norway spruce. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 36 (1): 57-60.
- LI H.; SMITH S. E.; HOLLOWAY R.E.; ZHU Y.; SMITH F. A. 2006. "Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to phosphorus uptake by wheat grown in a phosphorus-fixing soil even in the absence of positive growth responses.". *New Phytol.* 172 (3): 536-543.
- LÓPEZ-ESCAMILLA, A. L.; OLGUÍN-SANTOS L. P.; MÁRQUEZ J.; CHÁVEZ V. M.; BYE R. 2000. Adventitious bud formation from mature embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, an endangered Mexican spruce tree. *Annals of Botany* 86: 921-927.
- MÁPULA L., M.; LÓPEZ U., J.; VARGAS H. J. J.; HERNÁNDEZ L. A. 2007. Reproductive indicators in natural populations of Douglas-fir in Mexico. *Biodiv. Conserv.* 16(3): 727-742.
- MÁPULA L., M.; LÓPEZ U., J.; VARGAS H., J.J.; HERNÁNDEZ L. A. 2008. Germinación y vigor de semillas de *Pseudotsuga menziesii* de México. *Ra Ximhai* 4: 119-134.
- MCKELLAR, D. S.; HERMAN, B.; WATT, M. P. 1994. Towards a protocol for the micropropagation of *Pinus patula* Scheide et Deppe. *South African Forestry Journal* 171: 33-42.
- MC COWN, B. H. 1988. Adventitious rooting of tissue cultured plants. *In: DAVIS T. M.; HASSING B.; SANKHLA, N. Adventitious Formation in Cuttings.* Portland. USA. 289-302 pp.
- MONJARÁS G., G. 2004. Cultivo *in vitro* de *Pseudotsuga macrolepis* Fluos, especie mexicana sujeta a protección especial. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F.
- MURASHIGE, T.; NAKANO, R. 1986. Chromosome complement as a determinant of the morphogenic potential of tobacco cells. *Amer. J. Bot.* 54: 963-979 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- MOSELER, A; MAJOR, J. E.; SIMSOM, J. D.; DAIGLE, B.; LANGE, K.; PARK, Y. S.; JOHNSON, K. H.; RAJORA, O. P. 2000. Indicators of population viability in red spruce *Picea rubens* I. Reproductive traits and fecundity. *Can. J. Bot.* 78: 298-940.
- PULLMAN, G. S.; NAMJOSHI, K.; ZHANG, Y. 2003. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*P. taeda* L.): improving culture initiation with abscisic acid and silver nitrate. *Plant-Cell Report* 22 (2): 85-95.
- REYES H., J. V.; J. J. VARGAS H.; LÓPEZ U. J.; VAQUERA H. H. 2005. Variación morfológica y anatómica en poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga* (Pinaceae). *Acta Bot. Mex.* 70: 47-67.
- REYES H., J. V.; VARGAS H. J. J.; LOPEZ U. J.; VAQUERA H. H. 2006. Similitud fenotípica de poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga* Carr. *Agrociencia* 40: 545-556.
- SACCHERI, I.; KUUSSAARI, M.; KANKARE, M.; VIKMAN, P.; FORTÉLIUS W.; HANSKI I. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392: 491-494.

- SALAJOVA, T.; JASIK J.; KORMUTAK A.; SALAJ J.; HAKMAN I. 1996. Embryogenic culture initiation and somatic embryo development in hybrid firs (*Abies alba* x *A. cephalonica* and *A. alba* x *A. numidica*). *Plant Cell Reports* 15: 527-530.
- SAS. 1999. Statistical Analysis and Reporting System User Guide Version 1.0. International Business Machines Corporation (IBM). <http://www-01.ibm.com/support/docview.wss?uid=ssg1S7000247&aid=1>. Consultado en enero 2010.
- SCHENK R. U.; HILDEBRANDT A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204
- SEMARNAP. 2001. La producción de árboles de navidad en México. Documento de Información al público. 10 p. www.conafor.gob.mx
- TANG, W.; GUO, Z. C.; OUYANG, F. 2001a. Plant regeneration from embryogenic cultures initiated from mature loblolly pine zygotic embryos. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 37(5): 558-563.
- TANG, W. 2001b. *In vitro* propagation of loblolly pine via direct somatic organogenesis from mature cotyledons and hypocotyls. *Plant Growth Regulation* 33 (1): 25-31.
- VELASCO G., M. V.; LÓPEZ U. J.; ANGELES P. G.; VARGAS H. J. J.; GUERRA DE LA C. V. 2007. Dispersión de semillas de *Pseudotsuga menziesii* en poblaciones del centro de México. *Agrociencia* 41: 121-131.
- VENTURA-RÍOS, A.; LÓPEZ-UPTON, J.; VARGAS-HERNÁNDEZ J. J.; GUERRA DE LA CRUZ V. 2010. Caracterización de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco en el centro de México. Implicaciones para su conservación. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 33 (2): 107-116.