

**ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO EFICIENTE DE GERMINACIÓN
IN VITRO Y MICROPROPAGACIÓN DEL CIRIMO (*TILIA MEXICANA*
SCHLECHT.) (TILIACEAE)****ESTABLISHMENT OF AN EFFICIENT METHOD OF *IN VITRO* GERMINATION
AND MICROPROPAGATION OF THE CIRIMO TREE (*TILIA MEXICANA*
SCHLECHT.) (TILIACEAE)**

**Wendy Zurita-Valencia¹, J. Elmar Gómez-Cruz², Esteban Atrián-Mendoza²,
Alejandra Hernández-García², María Elena Granados-García³, J. Jesús García-
Magaña⁴, Rafael Salgado-Garciglia² y Nahum M. Sánchez-Vargas⁵**

¹Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera- Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Edif. D, Ciudad Universitaria, CP 58060, Morelia, Michoacán, México.

²Lab. de Biotecnología Vegetal, Instituto de Investigaciones Químico- Biológicas, UMSNH, Edif. B3.

³Depto. de Biología Básica, Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, UMSNH, Av. San Juanito Itzicuaru s/n, col. Nueva Esperanza, CP 58337, Morelia, Mich., Méx.

⁴Facultad de Agrobiología Presidente Juárez, UMSNH, Lázaro Cárdenas y Berlín s/n, colonia Viveros, CP 60170, Uruapan, Mich., Méx.

⁵Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, UMSNH, Km 9.5 carr. Morelia-Zinapécuaro, CP 58880, Tarímbaro, Mich., Méx. Correo electrónico: rsalgado@umich.mx

RESUMEN

Para obtener un método eficiente de germinación y la micropropagación de *Tilia mexicana* Schlecht. (cirimo), se establecieron cultivos *in vitro* con la siembra de semillas recién colectadas en época de fructificación, mismas que fueron sometidas a desinfección superficial y a diferentes métodos de escarificación previo al cultivo *in vitro* en el medio nutritivo de Murashige y Skoog (MS) con 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar y 0.05 mg/L de benciladenina (BA). Después de 60 días del cultivo, el mayor porcentaje de germinación fue de un 74% en semillas tratadas con HCl 10% durante cinco minu-

tos, lo que permitió un óptimo desarrollo y mayor número de plántulas. A los 90 días del cultivo, las plántulas alcanzaron 4.5 cm de altura, con hojas y raíces bien desarrolladas, mismas que fueron utilizadas para los protocolos de micropropagación. La multiplicación de brotes se obtuvo mediante la siembra de yemas axilares en medio MS con diferentes concentraciones de auxina/citocinina (ANA/BA). El mayor número de brotes (7.75 brotes/explante) se logró con la adición de ácido naftalenacético (ANA) (0.25 mg/L) en combinación con BA (1.0 mg/L) a los 60 días del cultivo. Los brotes regenerados fueron cultivados en medio MS con ácido indolbutírico (AIB), mostrando

un 100% de enraizamiento con 5.0 mg/L, a los 45 días del cultivo. Las plántulas micropropagadas de *T. mexicana*, presentaron en promedio una altura de 4.51 cm, produciendo 3.3 raíces/plántula de 2.27 cm de longitud, las que fueron trasplantadas y aclimatadas en condiciones de cámara de crecimiento, para posteriormente ser cultivadas en invernadero. Después de 90 días de cultivo en invernadero, se observó un 70% de supervivencia.

Palabras clave: *Tilia mexicana*, cultivo *in vitro*, yemas axilares, multiplicación de brotes, escarificación.

ABSTRACT

To achieve an efficient method of germination and micropropagation of *Tilia mexicana* Schlecht. (cirimo), seeds recently collected at time of fruiting, were *in vitro* cultured. Previously to *in vitro* culture in Murashige and Skoog (MS) nutritive medium with 30 g/L of sucrose, 8 g/L of agar and 0.05 mg/L of benzyladenine BA, seeds were subjected to surface disinfection and different methods of scarification. After 60 days cultured, the highest percentage of germination was 74% in seeds treated with HCl 10% for 5 minutes, allowing optimal development and a major number of seedlings. The seedlings 90 days of cultivation were 4.5 cm in height, with leaves and well-developed roots, these plants were used for the micropropagation protocols. The shoot multiplication was obtained through the axillary buds cultured in MS medium with different concentrations of auxin/cytokinin (NAA/BA). The largest number of shoots (7.75 shoots/explant) was obtained with the addition of naphthalene acetic acid (NAA) (0.25 mg/L) in com-

ination with BA (1.0 mg/L) at 60 days of cultured. The regenerated shoots were cultured in MS medium supplemented with indolbutyric acid (IBA), showing 100% rooting with 5.0 mg/L at the 45 days of cultivation. The micropropagated *T. mexicana* plantlets showed on average a height of 4.51 cm, producing 3.3 roots/plantlet of 2.27 cm in length, those were transplanted and acclimatized in growth chamber conditions, then be grown in a greenhouse. After 90 days of cultivation in the greenhouse, 70% of survival was observed.

Key words: *Tilia mexicana*, *in vitro* culture, axillary buds, shoot multiplication, scarification.

INTRODUCCIÓN

La especie *Tilia mexicana* Schlecht., conocida como cirimo en Michoacán, es uno de los árboles más apreciados por los artesanos, sobre todo por los fabricantes de guitarras, máscaras, figuras y utensilios tallados a mano, por lo que está reportada como fuente de madera para la elaboración de artesanías en el inventario de especies vegetales y animales de uso artesanal realizado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) (Bravo-Marentes y López-Gómez, 1999). Además, sus flores son utilizadas en la medicina tradicional como calmante nervioso por sus propiedades antiansiolíticas y sedativas (Pavón y Rico-Gray, 2000; Aguirre-Hernández *et al.*, 2007; Pérez-Ortega *et al.*, 2008). Lo anterior ha resultado en una explotación irracional de este recurso, ya que el corte de las flores provoca en la mayoría de las veces la muerte de los individuos (Pavón y Rico-Gray, 2000).

A partir de la década de los 80 en el siglo pasado ha sido difícil conseguir su madera, por lo que muchos de los artículos que se fabricaban exclusivamente de cirimo, se sustituyeron con los de pino, principalmente pino lacio (*P. devoniana* var. *cornuta*) (Guridi, 1980). Debido a la sobreexplotación de este árbol, actualmente está catalogado como en peligro de extinción por la *Norma Oficial Mexicana* NOM-ECOL-059-2010 (SEMARNAT, 2010), por lo que es urgente y necesaria su conservación.

Tilia mexicana tiene problemas de propagación, los árboles de este género producen semillas con un pericarpio duro e impermeable, además de que exhiben doble dormancia y requieren de tratamientos de escarificación y estratificación (Rowe y Bazich, 2008), por esta razón se ha intentado multiplicarlo mediante técnicas sexuales y asexuales con poco éxito. Algunos autores mencionan que estos tipos de dormancia pueden ser superados con tratamientos que incluyan el uso de ácidos o estratificándolas a bajas temperaturas obteniendo hasta un 50% de germinación (García-Magaña, 1994). Muñoz-Flores *et al.* (2011) tuvieron éxito en la propagación clonal obteniendo el 39.3% de enraizado de estacas obtenidas de árboles adultos, aplicando ácido indolbútrico (AIB).

El establecimiento de cultivos *in vitro* mediante la siembra de semillas ofrece grandes ventajas para la propagación: 1) proporciona de una manera rápida plántulas que sirven como fuente de explantes para llevar a cabo la micropropagación; 2) es una manera de conservar plántulas con variabilidad genética natural, y 3) es un método que permite la germinación de semillas que de forma natural no lo hacen o es muy difícil de

hacer en condiciones normales (Fay, 1992; Pierik, 1993).

La germinación *in vitro* tiene ventajas respecto a la producida en condiciones naturales, ya que puede solucionar casos de inhibición total de la germinación, aumentar la tasa de germinación, reducir el tiempo y homogeneizar la germinación (López-Encina y González-Padilla, 1996).

Con el cultivo de tejidos vegetales, utilizando partes aisladas de la planta (semillas, embriones, hojas, tallos, raíces, flores, frutos, anteras, microsporas, células, protoplastos, etc.) se puede llevar a cabo la clonación de árboles de importancia forestal con el fin de obtener su mejoramiento genético, propagación masiva o simplemente recuperarlo si éste se encuentra dentro de alguna categoría de extinción (Roca y Mroginski, 1993; Pierik, 1997). Varias especies forestales se propagan por esta vía, géneros como *Pinus*, *Thuja*, *Quercus*, *Picea*, *Abies*, *Sequoia*, *Pawlonia*, *Ulmus*, *Eucalyptus*, entre otros ya sea por medio de la regeneración de brotes (organogénesis) o por la formación de embriones somáticos (embriogénesis somática) (Nehra *et al.*, 2005).

La micropropagación ya ha sido reportada con éxito en especies del género *Tilia*: Chalupa (1987) indujo la regeneración de brotes en yemas de *T. cordata* Mill.; Youn *et al.* (1989) consiguieron la regeneración *in vitro* de plántulas de *T. amurensis* Rupr. por el cultivo de yemas; Chalupa (1990) propagó plantas de *T. cordata* con embriones somáticos a partir de embriones cigóticos inmaduros y las estableció exitosamente en suelo; Chalupa (2003) obtuvo la multiplicación *in vitro* de brotes en segmentos nodales de plantas adultas de *T. platyphyllos* Scop.

El cultivo *in vitro* es una herramienta que puede ser aplicada a especies como *T. mexicana*, con la que puede aumentarse el porcentaje de germinación mediante la siembra de semilla en conjunto con técnicas de escarificación, así como para conseguir su propagación masiva a través de la micro-propagación.

En la presente investigación se establecieron cultivos *in vitro* de *T. mexicana*, determinando las condiciones óptimas de la germinación y de la regeneración de plántulas *in vitro* a partir de yemas axilares, vía la multiplicación de brotes y enraizamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colecta de semillas

Las semillas de *T. mexicana* fueron colectadas de un árbol durante su época de fructificación (mes de octubre) situado en la localidad de Ichaqueo, municipio de Morelia (19° 34' 00" N, 101° 08' 45" O). Esta comunidad se ubica a 17 km al sur de Morelia, capital del estado de Michoacán, México. Tiene una altura de 2 300 m sobre el nivel del mar y posee un clima C(w2) que corresponde a un clima templado a frío con abundantes lluvias en verano. El bosque comprende una inmensa superficie, llena de ríos y cascadas, donde predominan el pino y encino y habitan muchas especies de animales y plantas, algunas de ellas endémicas (INEGI, 2005; Clave geoestadística 16053, 2009).

Germinación *in vitro*

A los frutos se les eliminó el pericarpio para obtener semillas puras, las que se lavaron con agua y detergente comercial, poste-

riormente fueron escarificadas utilizando tratamientos con temperatura y ácido clorhídrico (HCl), por separado. El tratamiento con temperatura consistió en la inmersión de las semillas en agua a tres diferentes temperaturas (30, 60 y 90°C) a diferentes tiempos (1, 5 y 10 min), para el tratamiento con ácido se empleó una solución de HCl en tres diferentes concentraciones (1, 5 y 10%) con inmersión a tiempos de 1, 5 y 10 min (cuadro 1). El tratamiento control (testigo) consistió en cultivar las semillas sin ningún tratamiento de escarificación (TE0). Posterior a la escarificación, las semillas se desinfectaron superficialmente por tratamiento con etanol al 70% por 3 min, seguido de inmersión durante 3 min en agua oxigenada al 3% y por último durante 30 min en una solución de hipoclorito de sodio con una concentración de cloro activo de 2.4%, con tres enjuagues en agua destilada estéril, dejando en remojo por 24 h. La siembra de las semillas se realizó en campana de flujo laminar, colocando tres semillas en cada frasco conteniendo 20 mL de medio de cultivo, cultivando un total de 150 semillas (50 frascos de cultivo). Se determinaron los tiempos tanto de inicio de la germinación como en el cual se alcanzó el máximo porcentaje de germinación, los registros se realizaron cada 30 días.

Medios y condiciones de cultivo

El medio nutritivo MS (Murashige y Skoog, 1962) fue utilizado tanto para la siembra de semillas como para los estudios de regeneración *in vitro*, le fueron adicionados 30 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar, ajustando el pH a 5.7, probando diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento. Las semillas se cultivaron en MS con 0.05 mg/L de benciladenina (BA), la multiplicación de

Cuadro 1. Tratamientos pregerminativos (escarificación) en semillas de *Tilia mexicana* para la germinación *in vitro*.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tratamiento	Ácido (HCl) (%)
TE1	30, 1 min	TE10	1, 1 min
TE2	30, 5 min	TE11	1, 5 min
TE3	30, 10 min	TE12	1, 10 min
TE4	60, 1 min	TE13	5, 1 min
TE5	60, 5 min	TE14	5, 5 min
TE6	60, 10 min	TE15	5, 10 min
TE7	90, 1 min	TE16	10, 1 min
TE8	90, 5 min	TE17	10, 5 min
TE9	90, 10 min	TE18	10, 10 min

brotos se evaluó en presencia de la combinación de ácido naftalenacético (ANA) y BA, el enraizamiento de brotes en MS con ácido indolbutírico (AIB). Los frascos de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 15 lb/pulg² durante 20 minutos.

La incubación de semillas, inducción de brotes, enraizado y desarrollo de plántula se realizó en cuarto de cultivo con una intensidad de luz de 36 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{seg}$, un fotoperíodo de 16 horas luz y una temperatura de 25°C.

Multiplicación de brotes

Como explantes fueron utilizadas yemas axilares de plántulas germinadas *in vitro* de 60 días de cultivo, cultivándolas en MS, en 11 tratamientos de combinaciones de ANA y BA con diferentes concentraciones (cuadro 2). Se cultivó un nudo por frasco de

cultivo, de 0.5 cm de longitud, conteniendo dos yemas axilares, realizando 10 repeticiones. Cada 15 días se determinó el porcentaje de brotación (número de explantes con brote/100), el número de brotes por explante y el tamaño de los mismos (cm).

Enraizado de brotes y desarrollo de plántulas

Los brotes regenerados fueron separados y se cultivaron tres por cada frasco de cultivo con medio MS y diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (AIB) (0, 1, 2.5, 5 y 10 mg/L), para inducir la formación de raíces y lograr la regeneración de plántulas, se emplearon 30 repeticiones. El seguimiento de la respuesta a la inducción de raíz y el desarrollo de plantas regeneradas se realizó cada 15 días. Se determinó el porcentaje de enraizamiento, número de raíces y el tamaño de éstas, altura de la plántula y número de nudos.

Cuadro 2. Tratamientos de auxina y citocinina en combinación ANA/BA (mg/L) para la inducción de formación de brotes *in vitro* en yemas axilares de *Tilia mexicana*.

Tratamiento	ANA (mg/L)	BA (mg/L)
TB0 (testigo)	0	0
TB1	0.10	0.10
TB2	0.10	0.25
TB3	0.10	0.50
TB4	0.10	1.00
TB5	0.25	0.25
TB6	0.25	0.50
TB7	0.25	1.00
TB8	0.50	0.50
TB9	0.50	1.00
TB10	1.00	1.00

Trasplante y aclimatación

Las plántulas micropropagadas se mantuvieron bajo cultivo *in vitro* por 90 días para conseguir plántulas aptas para el trasplante y aclimatación, y conseguir su cultivo en invernadero. El trasplante de 50 plántulas se llevó a cabo usando como sustrato una mezcla de turba-agrolita (proporción 1:1), realizada la aclimatación con la siembra de las plántulas bajo condiciones de alta humedad relativa en charolas de plástico transparente (20 x 20 cm), la cual gradualmente fue disminuida hasta un 70% con la apertura gradual de éstas. Se realizaron riegos por aspersión cada 24 h durante cuatro semanas, en condiciones de laboratorio sin control de luz ni temperatura. Posteriormente, cada plántula fue sembrada en forma individual en macetas de 10 x 10 cm conteniendo el

mismo sustrato usado durante la aclimatación, para finalmente cultivarlas en invernadero bajo condiciones no controladas de luz ni temperatura. Se determinó el porcentaje de supervivencia a los 90 días de su cultivo en invernadero.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico por ANOVA en una vía y la prueba de Tukey para la separación de las medias de los tratamientos. Las semillas, explantes (nudos) y brotes fueron considerados como réplicas. Para el análisis estadístico, los valores expresados como porcentaje fueron transformados por la función arcoseno. La significancia para todas las pruebas estadísticas se fijó en un nivel de $p < 0.05$. Se utilizó el paquete estadístico SPSS de Windows (9.0). Los



Fig. 1. A. *Árbol de Tilia mexicana*, B. Semillas de colecta reciente, C. Semillas sin pericarpio y D. Semillas cultivadas *in vitro* en medio MS con 0.05 mg/L de BA.

datos se presentan como la media más el error estándar y las diferencias estadísticas se muestran con letras diferentes.

RESULTADOS

El árbol de *T. mexicana* seleccionado en Ichaqueo, Morelia, Michoacán, México, medía 12 m de altura y 38 cm de diámetro (fig. 1A), del cual fueron colectadas las semillas aún con la bráctea que contiene los frutos (fig. 1B); para los tratamientos de escarificación se les eliminó la cubierta (fig. 1C) y una vez densinfestadas superficialmente, se sembraron en el medio de cultivo de germinación (MS con 0.05 mg/L de BA) (fig. 1D).

Germinación de las semillas *in vitro*

El proceso de germinación inició a los 30 días después del cultivo *in vitro*, aunque el tiempo y porcentaje de germinación fueron dependientes de los tratamientos de escarificación. En las semillas sin tratamiento (TE0) se observó un mayor tiempo (90 días) y bajo porcentaje de germinación (14%); las tratadas con 10% de HCl durante 5 min (TE17) fueron las que mostraron el menor tiempo de germinación (60 días) y el mayor porcentaje de germinación (74%). En los tratamientos con temperatura el mayor porcentaje de germinación (22%) se obtuvo a los 90 días con 30°C durante 10 minutos (TE3) y 60°C durante 30 y 60 min (TE5 y TE6). En general, los tratamientos con temperatura presentaron los menores porcentajes de germinación al compararse con la respuesta de los tratamientos con HCl en las diferentes concentraciones y tiempos de exposición. En ningún tratamiento se logró un 100% de germinación (cuadro 3).

Las plántulas germinadas de semillas tratadas con TE17 mostraron una altura promedio de 4.57 cm, con la aparición de hojas verdaderas y de 2 a 3 raíces de hasta 1.25 cm de longitud, a los 90 días de cultivo (fig. 2A). Éstas fueron fuente de explantes para la siembra de yemas axilares y lograr la multiplicación de brotes en medio con reguladores de crecimiento.

Multiplicación de brotes

La respuesta de brotación múltiple fue muy variada, se observó una respuesta negativa a la formación de brotes en algunos tratamientos, con crecimiento del ápice (elongación) y un número de brotes entre 1.17 y 7.75 dependiendo de las dosis de los reguladores de crecimiento (fig. 3). Los explantes cultivados en MS con 0.25 mg/L de ANA y 1.0 mg/L de BA (TB7) produjeron 7.75 brotes en un periodo de 60 días, valor máximo obtenido entre todos los tratamientos (fig. 2B). Otros tratamientos con mejores resultados de multiplicación de brotes fueron aquellos donde se logró un promedio de 4.52 y 3.75 brotes por yema, como el TB8 y TB9, respectivamente. Se encontró una diferencia significativa en el número de brotes por explante del tratamiento TB7 en relación a los demás (fig. 3). El porcentaje de brotación fue de un 90% en todos los tratamientos que respondieron a la formación de brotes.

En los tratamientos TB0 y TB1, los explantes no respondieron a la inducción de brotes, los cultivados en TB0 (sin reguladores de crecimiento) permanecieron viables con un ligero desarrollo de las yemas. Sin embargo, en los cultivados en TB1 (0.1 mg/L de ANA y 0.1 mg/L de BA) se presentó la

Cuadro 3. Porcentajes de germinación en semillas de *Tilia mexicana* cultivadas *in vitro* bajo diferentes tratamientos de escarificación en MS con 0.05 mg/L de BA: testigo, sin ningún tratamiento de escarificación (TE0); con temperatura (TE1 a TE9); y con ácido clorhídrico (TE10 a TE19). Las diferentes letras muestran las diferencias estadísticamente significativas.

Tratamiento	Germinación (%)		
	30 días	60 días	90 días
TE0 (testigo)	7	12 e	14 e
TE1	9	14 e	18 de
TE2	9	14 e	21 d
TE3	11 d	16 d	22 d
TE4	14 cd	16 d	18 d
TE5	14 cd	18 d	22 d
TE6	18 c	20 d	22 d
TE7	10 d	11 e	11 e
TE8	8 e	9 f	10 e
TE9	8 e	9 f	10 e
TE10	18 c	22 d	30 c
TE11	18 c	26 d	32 c
TE12	18 c	28 cd	34 c
TE13	22 b	34 c	34 c
TE14	22 b	36 c	36 c
TE15	20 b	26 d	32 c
TE16	24 b	48 b	50 b
TE17	32 a	74 a	74 a
TE18	24 b	52 b	52 b

elongación del tallo, alcanzando una altura de hasta 4.53 cm a los 30 días del cultivo. En los explantes del tratamiento TB10, se desarrolló la formación de callo lignificado, sin desarrollo de brotes. Los brotes de mayor tamaño fueron los regenerados en el tratamiento TB2, con 3.53 cm, seguidos por los del tratamiento TB3 y TB5, con brotes de 2.71 y 2.51 cm de altura, respectivamente (fig. 3B). Los brotes del tratamiento con mejor respuesta en brotación (TB7), alcanzaron una altura promedio de 2.11 cm.

Enraizamiento y desarrollo de plántulas

Los brotes micropropagados fueron cultivados en MS con las diferentes concentraciones de AIB para estimular la proliferación de raíces (fig. 2C). Desde los 15 días del cultivo una gran parte de los explantes (80%) formaron raíces, el número y tamaño de ellas dependió de la concentración del AIB. A los 45 días del cultivo, solo los brotes cultivados en MS con 5.0 mg/L de AIB mostraron un 100% de enraizamiento, las plántulas resul-

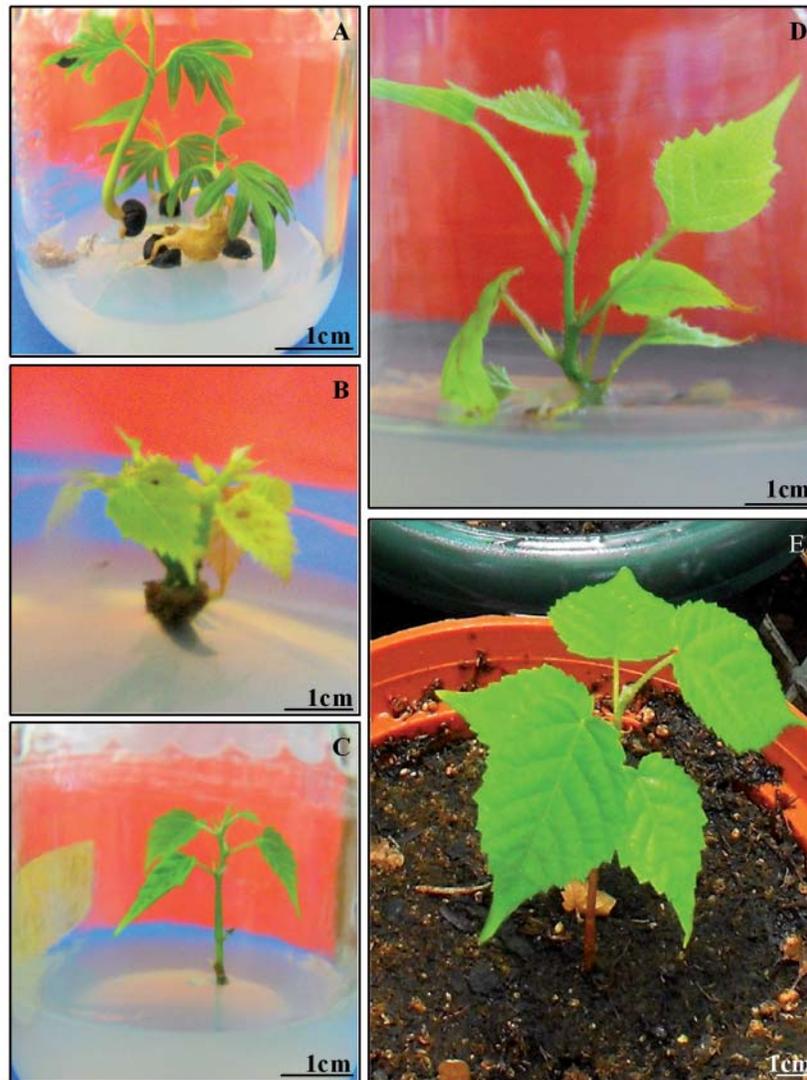


Fig. 2. Propagación *in vitro* por semilla y micropropagación de *Tilia mexicana*: A. Germinación *in vitro*, a los 90 días de cultivo en medio MS; B. Multiplicación de brotes en yema axilar, a los 60 días de cultivo en medio MS; C. Brote micropropagado sometido a enraizamiento; D. Plántulas micropropagadas de 45 días; E. Plántulas de 90 días cultivadas en invernadero.

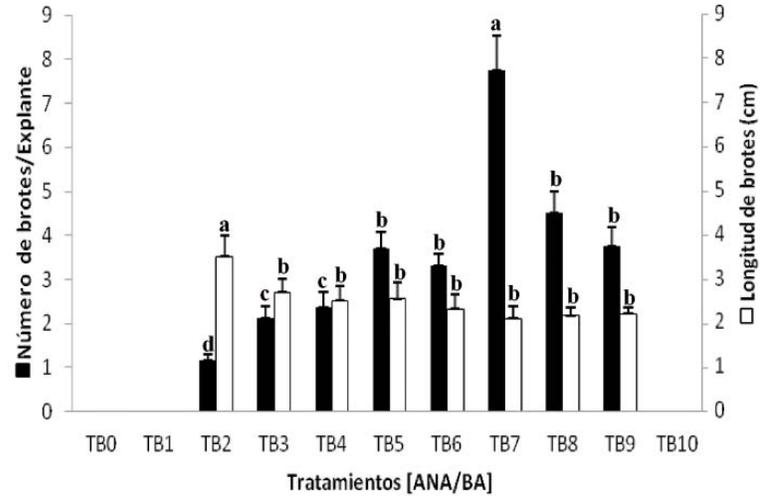


Fig. 3. Influencia de los tratamientos ANA/BA en la multiplicación *in vitro* de brotes en yemas axilares de *Tilia mexicana*: Número de brotes (■); Longitud de brotes (□). Datos representan el promedio \pm error estándar a los 60 días de cultivo. Las diferentes letras muestran las diferencias estadísticamente significativas.

Cuadro 4. Influencia del ácido indolbutírico (AIB) sobre el número y tamaño de raíces en brotes micropropagados de *Tilia mexicana*, evaluados a los 45 días del cultivo. Las diferentes letras muestran las diferencias estadísticamente significativas.

AIB [mg/L]	Porcentaje de enraizado	Número de raíces/explante	Tamaño de raíces (cm)	Altura de plántula (cm)
0	0 d	0 d	0 d	0 d
0.1	0 d	0 d	0 d	0 d
1.0	12 c	1.71 \pm 0.134 bc	1.11 \pm 0.087 c	3.33 \pm 0.427 b
2.5	33 b	2.1 \pm 0.199 b	1.74 \pm 0.117 b	3.72 \pm 0.433 b
5.0	100 a	3.3 \pm 0.215 a	2.27 \pm 0.167 a	4.51 \pm 0.111 a
10.0	14 c	1.21 \pm 0.124 c	0.77 \pm 0.064 c	1.39 \pm 0.217 c

tantes lograron una altura de 4.51 cm con 3.3 raíces de 2.27 cm de longitud, las de mejor crecimiento (fig. 2D). En los tratamientos con baja concentración de AIB (0 y 0.1 mg/L) no se estimuló la formación de raíces, sin embargo en los demás tratamientos, aunque hubo la formación de raíces, la respuesta varió en cuanto al número de raíces, su tamaño y la altura de las plántulas (cuadro 4).

Trasplante y aclimatación

Las plántulas desarrolladas en el tratamiento con 5.0 mg/L de AIB fueron cultivadas bajo alta humedad relativa por cuatro semanas y posteriormente en invernadero por 90 días. A este tiempo, las plántulas alcanzaron una altura de 11.5 cm con hojas y raíces bien desarrolladas, mostrando una supervivencia del 70% (fig. 2E).

DISCUSIÓN

Tilia mexicana, una planta leñosa con dificultades de propagarse tanto sexual como asexualmente (García-Magaña, 1994), es un ejemplo de las miles de especies que requieren métodos alternativos a los convencionales para lograr no sólo su propagación, sino la conservación de su germoplasma, ya que es una especie en peligro de extinción (SEMARNAT, 2010). En la presente investigación se presentan resultados alentadores para conseguirlo, ya que fue posible su germinación *in vitro* en porcentajes mayores al 70%, determinando además, las condiciones óptimas de la regeneración de brotes en yemas axilares y el desarrollo de plántulas, las cuales pudieron ser cultivadas en condiciones de crecimiento en invernadero.

Los resultados de la germinación concuerdan con la aseveración de Baily (1961),

quien reporta que la recolección temprana de frutos de *Tilia* cuando éstos se tornan color café tenue, es recomendable para realizar su siembra, y que los mayores porcentajes de germinación de semillas de *Tilia* resultan cuando los frutos son colectados en fechas muy cercanas a la época de caída de los frutos y sembradas de inmediato.

Sin embargo, los tratamientos de escarificación en combinación con el cultivo *in vitro* fueron determinantes para un incremento sobre el porcentaje de germinación en semillas de *T. mexicana*, ya que las semillas cultivadas *in vitro* sin tratamiento de escarificación mostraron solamente un 14% de germinación. Con los tratamientos de escarificación con ácido clorhídrico se obtuvieron los más altos porcentajes de germinación (cuadro 3). Las semillas del mismo árbol de *T. mexicana* cultivadas en invernadero sin escarificación mostraron un 9% de germinación a los 90 días después del cultivo (datos no mostrados). Este porcentaje no concuerda con lo mencionado por García-Magaña (1994), quien recomienda sembrar la semilla recién colectada cuando se encuentra en sus primeras fases de maduración sin aplicar tratamiento de escarificación, solamente secarla, con lo cual se consiguen porcentajes de viabilidad y germinación alrededor del 50%. Por lo tanto, el método de escarificación ácida (HCl 10%, 5 min) en conjunto con el cultivo de semillas *in vitro* de colecta reciente, son factores que promueven un alto porcentaje de germinación (74%).

Este trabajo constituye un avance en el establecimiento de cultivos *in vitro* de yemas axilares de *T. mexicana*, ya que con este método pueden cultivarse yemas de plantas de semillas provenientes de diferentes

individuos y diversas localidades, con el fin de tener una mayor variabilidad genética y conseguir su propagación con propósitos de repoblación o conservación.

En la etapa de regeneración de brotes en yemas axilares de *T. mexicana* los resultados indican que la concentración ideal para obtener el máximo número de brotes correspondió al tratamiento TB7 (1.0 mg/L de BA con 0.25 mg/L de ANA). Para la formación de brotes *in vitro*, Thorpe y Biondi (1982) señalan que se requiere un balance preciso de los componentes del medio para interactuar con el tejido y determinar la respuesta morfogénica, especialmente de la interacción cuantitativa entre auxinas y citocininas y otros factores como luz y temperatura, entre otros.

El efecto observado por la concentración de BA en la brotación de yemas axilares y apicales de *T. mexicana*, concuerda con los reportado por Orellana (1998), quien señala que la citocinina BA es la más efectiva y empleada para la inducción de brotes. En especies leñosas se describe el uso de concentraciones más altas (Saborio *et al.*, 1997; Vilchez *et al.*, 2009) o más bajas de este regulador de crecimiento (Vidales *et al.*, 2001). Los resultados de esta investigación coinciden con los de Puddephat *et al.* (1997), donde con 1 mg/L de BA se consiguen óptimos resultados de brotación en *Quercus robur* L. En esta prueba también se observó que cuando no se utilizan reguladores de crecimiento se obtiene una buena longitud del brote, pero sin que éste se multiplique, en algunas especies esta etapa es necesaria para desarrollar el brote, antes de la inducción de raíces o de la aclimatación. Lo antes mencionado coincide con Von Arnold (1988) quien

señala que frecuentemente es necesario eliminar las citocininas para el alargamiento y el enraizamiento de los brotes.

En segmentos nodales de plántulas germinadas *in vitro* de *Tilia platyphyllos*, la adición de una concentración baja de BA (0.6 mg/L) resultó en la máxima producción de brotes, aunque sólo se obtuvieron 3.3 brotes/explante (Chalupa, 2003). En explantes tanto de *T. cordata* como de *T. amurensis*, se han reportado dosis efectivas de 1.0 a 5.0 mg/L de BA para la multiplicación de brotes, con un número de brotes entre tres y cinco brotes/explante (Chalupa, 1984; Youn *et al.*, 1989). Youn *et al.* (1988) sugiere que para conseguir la multiplicación de brotes en yemas de plantas adultas de *Tilia* spp, deben de adicionarse concentraciones más altas de BA (1.0 a 5.0 mg/L). El número de brotes regenerados *in vitro* de estas especies de *Tilia*, es un número inferior a lo encontrado en yemas axilares de *T. mexicana*.

Los sistemas de enraizamiento como etapa final en un proceso de micropropagación, permiten obtener plántulas en óptimas condiciones para su trasplante y aclimatación. En el sistema de enraizamiento para brotes de *T. mexicana*, empleando ácido indolbutírico (AIB), la mejor respuesta tanto en número y tamaño de las raíces se obtuvo al cultivar los brotes en 5.0 mg/L de AIB con un 100% de enraizamiento. Estas plántulas fueron aptas para el trasplante y aclimatación, ya que mostraron un óptimo desarrollo y una supervivencia del 70% al cultivarlas en invernadero. El enraizado de brotes en *Tilia* spp ha sido obtenido al cultivar los brotes en MS conteniendo de 0.1 a 0.5 mg/L de AIB (Chalupa, 1984; Chalupa, 1987; Chalupa, 2003).

CONCLUSIONES

El mayor porcentaje de germinación *in vitro* en las semillas de *Tilia mexicana* se obtuvo con el tratamiento de escarificación ácida (HCl 10%, 5 min). La máxima respuesta de multiplicación de brotes en yemas axilares se obtuvo con la combinación ANA/BA de 0.25 y 1 mg/L, respectivamente. Las plántulas micropropagadas presentaron un desarrollo de hasta 4.51 cm de altura, logrando un óptimo enraizamiento, al cultivarse en 5.0 mg/L de AIB. Las plántulas micropropagadas fueron aclimatadas y cultivadas en invernadero con un aceptable porcentaje de sobrevivencia.

AGRADECIMIENTOS

A la UMSNH, Proyecto CIC/RSG. Al CONACYT por beca otorgada a Zurita-Valencia W.

LITERATURA CITADA

- Aguirre-Hernández, E; A.L. Martínez, M.E. González-Trujano, J. Moreno, H. Vibrans, y M. Soto-Hernández, 2007. "Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. *mexicana* in mice". *J. Ethnopharm.*, **109**(1): 140-145.
- Baily, C.V., 1961. "Early collection and immediate sowing increase germination of basswood (*Tilia americana*) seed". *Tree Planter's Notes*, **46**: 27-28.
- Bravo-Marentes, C., y A.M. López Gómez, 1999. "Inventario de especies vegetales y animales de uso artesanal". *Biodiversitas*, **22**: 9-14.
- Chalupa, V., 1984. "In vitro propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.)". *Biol. Plant.*, **26**(5): 374-377.
- , 1987. "Effect of benzylaminopurine and thidiazuron on *in vitro* shoot proliferation of *Tilia cordata* Mill., *Sorbus aucuparia* L. and *Robinia pseudoacacia* L". *Biol. Plant.*, **29**: 425-429.
- , 1990. "Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.)". *Plant Cell Rep.*, **9**(7): 398-401.
- , 2003. "In vitro propagation of *Tilia platyphyllos* by axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis". *J. Forest Sci.*, **49**(12): 537-543.
- Clave geoestadística 16053, 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Morelia, Michoacán de Ocampo, México, 9 pp.
- Fay, M.F., 1992. "Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods". *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, **28**: 1-4.
- García-Magaña, J.J., 1994. "Tratamientos pre germinativos para la propagación en vivero *Tilia mexicana* Schlecht." Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. INIFAP. CIRPAC. Boletín Téc., **27**: 3-6.

- Guridi, G.L.I., 1980. "La madera en las artesanías del Estado de Michoacán. Instituto de Investigaciones Forestales, México, SARH/INIF". *Boletín Divulg.*, **50**: 129.
- INEGI, 2005. Marco Geoestadístico Municipal, versión 3.1. http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geoestadistica/M_Geoestadistico.aspx
- López-Encina, C., e I. González-Padilla, 1996. "A propósito de semillas". *Enc. en la Biol.*, **33**: 3.
- Muñoz-Flores, H.J.; G. Orozco-Gutiérrez, J.J. García-Magaña, V.M. Coria-Ávalos, R. Salgado-Garciglia, y M.R. Santiago-Santiago, 2011. "Épocas de colecta y tratamientos para enraizamiento de estacas de cirimo *Tilia mexicana* Schlecht. (Tiliaceae)". *Rev. Mex. Cien. For.*, **2**(3): 13-24.
- Murashige, T., y F. Skoog, 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- Nehra, N.S.; M.R. Becwar, W.H. Rottmann, L. Pearson, K. Chowdhury, S. Chang, H.D. Wilde, R.J. Kodrzycki, C. Zhang C., K.C. Gause, D.W. Parks, y M.A. Hinchee, 2005. "Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities". *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, **41**: 701-717.
- Orellana, P., 1998. "Propagación vía organogénesis". En: *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología* (Pérez J., Ed.). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba. pp. 151-178.
- Pavón, N., y V. Rico-Gray, 2000. "An endangered and potentially economic tree of Mexico: *Tilia mexicana* (Tiliaceae)". *Econ. Bot.*, **54**: 113-114.
- Pérez-Ortega, G.; P. Guevara-Fefer, M. Chávez, J. Herrera, A. Martínez, A.L. Martínez, y M.E. González-Trujano, 2008. "Sedative and anxiolytic efficacy of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences used traditionally by communities of State of Michoacan, Mexico". *J. Ethnopharm.*, **116**(3): 461-468.
- Pierik, R.L.M., 1993. "Micropropagation: Technology and Opportunities". En: *Plant biotechnology commercial prospects and problems* (Prakash, J.; Pierik R.L.M., Eds.), Science Publishers, Inc., Lebanon, pp. 9-22.
- , 1997. "In vitro culture of higher plants". Dordrecht, NL. Kluwer Academic Publishers. 348 pp.
- Puddephat, I.; P. Alderson, y N. Wright, 1997. "Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. *in vitro*". *J. Exp. Bot.*, **48**: 951-962.
- Roca, W., y L. Mroginski, 1993. *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 969 pp.

- Rowe, D.B., y F.A. Blazich, 2008. "Tilia L., linden or basswood". En: *The woody plant seed manual* (Bonner F.T.; R.P. Karrfalt, Eds.). U.S. Dept. Agr. For. Serv., Washington, D.C., *Agric.Hdbk.*, **727**: 1113-1118.
- Saborio, F.; W.S. Dvorak, J.K. Donahue, y T.A. Thorpe, 1997. "In vitro regeneration of plantlets from mature embryos of *Pinus ayacahuite*". *Tree Physiol.*, **17**: 787-796.
- SEMARNAT, 2010. NOM-059-ECOL-2010. "Protección ambiental - especies nativas de México de flora y fauna silvestre". Diario Oficial de la Federación, 30 de diciembre 2010, 77 pp.
- Thorpe, T., y F. Biondi, 1982. "Conifers". En: *Handbook of plant cell culture*. vol 2. Crop species (Sharp, W.R.; D.A. Evans, P.V. Ammirato, y Y. Yamada, Eds.), MacMillan, New York, pp. 435-470.
- Vidales-Fernández, I.; M. Aguilar-Ramírez, M.A. Gómez-Lim, y R. Salgado-Garciglia, 2001. "Establecimiento *in vitro* de tejido nucelar de aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. Hass". Reunión Interamericana de Ciencias Hortícolas. Oaxtepec, Morelos. Nota científica en memoria, pp. 369.
- Vilchez, J.; Y. Rivas, N. Albany, M. Molina, y L. Martínez, 2009. "Efecto de la N6 bencilaminopurina sobre la multiplicación *in vitro* de ocumo criollo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott)". *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, **26**(3): 212-222.
- Von Arnold, S., 1988. "Tissue culture methods propagation of forest trees". *Newsletter* (Holland), **1**(56): 1-13.
- Youn, Y.; K. Ishii, A. Saito, y K. Ohba, 1988. "In vitro plantlet regeneration from axillary buds of mature trees of *Tilia cordata*". *J. Jpn. For. Soc.*, **70**(7): 315-317.
- Youn, Y.; K. Ishii, A. Saito, y K. Ohba, 1989. "In vitro plantlet regeneration by bud culture and its multiplication in *Tilia amurensis* seedlings". *J. Jpn. For. Soc.*, **71**(2): 61-64.

Recibido: 7 agosto 2012. Aceptado: 8 noviembre 2013.