



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Métodos de propagación de la planta medicinal copalche
(*Hintonia latiflora*)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANA LAURA CASTAÑEDA HUITRÓN



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ALICIA ENRIQUETA BRECHÚ FRANCO
2010**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Castañeda

Huitrón

Ana Laura

53 55 59 13

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

301035130

2. Datos del tutor:

Dra.

Alicia Enriqueta

Brechú

Franco

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Guillermo

Laguna

Hernández

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Ángel

Villegas

Monter

5. Datos del sinodal 3

M. en C.

Sol

Cristians

Niizawa

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Ela

Alcántara

Flores

7. Datos del trabajo escrito.

Métodos de propagación de la planta
medicinal Copalche (*Hintonia latiflora*)

86 p

2010

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que me otorgó una formación académica universitaria y me ha brindado múltiples experiencias.

Al Laboratorio de Estructura y Fisiología de Plantas de la Facultad de Ciencias, el cual me proporcionó un espacio para desarrollar lo aprendido en las aulas.

A la Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco, a quien agradezco su paciencia, tiempo y fuerzas invertidas en este proyecto, así como sus consejos, revisiones, palabras de ánimo, amistad, risas y conocimientos, que hoy forman parte de mí formación académica y personal.

Al Dr. Ángel Villegas Monter, que me abrió las puertas del Laboratorio de Fruticultura en el Colegio de Posgraduados, me brindó su apoyo, amistad, risas, comentarios y conocimiento.

Al Técnico Académico Guillermo Arellano, por su asesoría, conocimiento y apoyo en el Laboratorio de Fruticultura en el Colegio de Posgraduados.

Al M. en C. Sol Cristians Niizawa, por sus comentarios, conocimiento, asesorías, viajes, historias y gran amistad.

A la M. en C. Ela Alcántara Flores, por su asesoría, comentarios, risas y amistad.

Al Dr. Guillermo Laguna Hernández, por sus comentarios y asesorías.

A la Dra. Helia Reyna Osuna Hernández, por sus comentarios y sugerencias.

A la M. en C. Rosa María Fonseca Juárez, Técnico Académico del Laboratorio de Taxonomía de Plantas Vasculares en la Facultad de Ciencias, UNAM, por su ayuda en la identificación taxonómica de *Hintonia latiflora*.

A la M. en F. Ana Isabel Bieler Antolín, Técnico Académico del Laboratorio de Microcine, Facultad de Ciencias, UNAM, por su apoyo en la toma de fotografías de los frutos y semillas de *Hintonia latiflora*.

Al M. en C. Armando Gómez Campos, por compartir su conocimiento de plantas medicinales.

ÍNDICE

	Pág.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1. Antecedentes botánicos	4
3.1.1. <i>Hintonia latiflora</i> (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock	4
3.1.1.1. Ubicación taxonómica	6
3.1.1.2. Nombre científico	6
3.1.1.3. Sinonimias	6
3.1.1.4. Nombres comunes	6
3.2. Propagación vegetativa	7
3.2.1. Acodos	8
3.2.2. Estacas	8
3.2.3. Cultivo <i>in vitro</i>	9
3.2.3.1. Auxinas	10
3.2.3.2. Citocininas	10
3.2.3.3. Giberelinas	11
3.3. Propagación Sexual	11
3.3.1. Germinación	12
4. JUSTIFICACIÓN	13
5. OBJETIVOS: GENERAL Y PARTICULARES	13
6. MATERIAL Y MÉTODO	14
6.1. Sitio de estudio	14
6.2. Sitio de trabajo	14
6.3. Material vegetal	14
6.4. Planeación del método general	16

6.5.Propagación vegetativa	17
6.5.1.Acodos	18
6.5.1.1. Planeación de los experimentos de Acodos	18
6.5.1.2. Experimento 1	19
6.5.1.2.1. Conducción del experimento	19
6.5.1.2.2. Análisis de datos	19
6.5.1.3. Experimento 2	21
6.5.1.3.1. Conducción del experimento	21
6.5.1.3.2. Análisis de datos	21
6.5.2.Estacas	22
6.5.2.1. Planeación de los experimentos de Estacas	22
6.5.2.2. Experimento 1	23
6.5.2.2.1. Conducción del experimento	23
6.5.2.2.2. Análisis de datos	23
6.5.2.3. Experimento 2	25
6.5.2.3.1. Conducción del experimento	25
6.5.2.3.2. Análisis de datos	25
6.5.3.Cultivo de tejidos vegetales (Cultivo <i>in vitro</i>)	25
6.5.3.1. Planeación de los experimentos del Cultivo <i>in vitro</i>	26
6.5.3.2. Prueba de Germinación	27
6.5.3.2.1. Conducción del experimento	27
6.5.3.2.2. Análisis de datos	28
6.5.3.3. Experimento 1: Efecto de la benciladenina (BA) en la propagación <i>in vitro</i> de Copalche	29
6.5.3.3.1. Conducción del experimento	29
6.5.3.3.2. Análisis de datos	29
6.5.3.4. Experimento 2: Efecto de dos tipos de recipientes: angostos (tubos de ensayo) y anchos (frascos) sobre la propagación <i>in vitro</i> de Copalche en medio sin reguladores de crecimiento	30

6.5.3.4.1.	Conducción del experimento	30
6.5.3.4.2.	Análisis de datos	30
6.5.3.5.	Experimento 3: Efecto de los reguladores de crecimiento AIB, AIA y BA, en el enraizamiento <i>in vitro</i> de Copalche	31
6.5.3.5.1.	Conducción del experimento	31
6.5.3.5.2.	Análisis de datos	32
6.5.3.6.	Experimento 4: Efecto de los reguladores de crecimiento AIB y AIA en el enraizamiento <i>in vitro</i> de Copalche	32
6.5.3.6.1.	Conducción del experimento	32
6.5.3.6.2.	Análisis de datos	32
6.6.	Propagación Sexual: Emergencia de plántulas	33
6.6.1.	Planeación del experimento de emergencia de plántulas	33
6.6.2.	Experimento de emergencia de plántulas	34
6.6.2.1.	Conducción del experimento	34
6.6.2.2.	Análisis de datos	34
7.	RESULTADOS	35
7.1.	Descripción de fruto y semilla de <i>Hintonia latiflora</i>	35
7.2.	Propagación vegetativa	38
7.2.1.	Acodos	38
7.2.1.1.	Experimentos 1 y 2	38
7.2.2.	Estacas	40
7.2.2.1.	Experimentos 1 y 2	40
7.2.3.	Cultivo <i>in vitro</i>	42
7.2.3.1.	Prueba de germinación	42
7.2.3.2.	Experimento 1: Efecto de la benciladenina (BA) en la propagación <i>in vitro</i> de Copalche	43
7.2.3.3.	Experimento 2: Efecto de dos tipos de recipientes: angostos (tubos de ensayo) y anchos (frascos) sobre la propagación <i>in vitro</i> de Copalche en medio sin reguladores de crecimiento	44
7.2.3.4.	Experimento 3: Efecto de los reguladores de crecimiento AIB, AIA y	48

BA, en el enraizamiento <i>in vitro</i> de Copalche	
7.2.3.5. Experimento 4: Efecto de los reguladores de crecimiento AIB y AIA en el enraizamiento <i>in vitro</i> de Copalche	52
7.3. Propagación Sexual	53
7.3.1. Emergencia de plántulas	53
8. DISCUSIÓN	55
8.1. Distribución geográfica	56
8.2. Sitio de estudio	56
8.3. Descripción del fruto y semilla	57
8.4. Propagación	57
8.4.1. Propagación vegetativa	58
8.4.1.1. Acodos y Estacas	58
8.4.1.2. Cultivo <i>in vitro</i>	61
8.4.1.2.1. Prueba de germinación	61
8.4.1.2.2. Experimento 1: Efecto de la benciladenina (BA) en la propagación <i>in vitro</i> de Copalche	62
8.4.1.2.3. Experimento 2: Efecto de dos tipos de recipientes: angostos (tubos de ensayo) y anchos (frascos) sobre la propagación <i>in vitro</i> de Copalche en medio sin reguladores de crecimiento	63
8.4.1.2.4. Experimento 3: Efecto de los reguladores de crecimiento AIB, AIA y BA, en el enraizamiento <i>in vitro</i> de Copalche	64
8.4.1.2.5. Experimento 4: Efecto de los reguladores de crecimiento AIB y AIA en el enraizamiento <i>in vitro</i> de Copalche	65
8.4.2. Propagación sexual	66
8.4.2.1. Germinación de semillas	66
9. CONCLUSIONES	69
10. PROPUESTAS	70
11. ANEXO	71
12. REFERENCIAS	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Núm.	Figura	Página
1	Árbol de Copalche (<i>H. latiflora</i>) en el sitio de estudio cerca de las parcelas de cultivo de J. David Tellitud (Santa. Rita), Huetamo, Michoacán, (Julio 2006, A. L. Castañeda Huitrón).	5
2	Localización del municipio de Huetamo de Núñez, en el Estado de Michoacán, México.	14
3	Árbol de Copalche (<i>H. latiflora</i>) en el sitio de estudio cerca de las parcelas de cultivo de J. David Tellitud (Santa. Rita), Huetamo, Michoacán, (Julio 2006, A. L. Castañeda Huitrón).	15
4	Esquema del procedimiento de acodado. Imagen tomada de http://articulos.infojardin.com/arboles/acodo-acodos-aereo-arboles.htm	20
5	Procedimiento de estacado: corte de ramas con tamaño uniforme, desinfectado y enjuagado, incisiones en la base de la estaca para la aplicación de tratamiento, enterrar en sustrato y poner una bolsa de plástico para mantener la humedad, (Brechú Franco, 2008).	24
6	Fotografías del fruto y de la semilla de <i>H. latiflora</i> , tomadas por la M. en F. Ana Isabel Bieler Antolín. A-B: cápsula obovada aguda en la base, 6-costada, lenticelada, de color café oscuro; C-D: cubierta que protege las hileras de semillas; E: semilla con cotiledones (c) y embrión (e).	36
7	Fotografías de las semillas con dos tipos de tinciones: A) Semilla teñida con Safranina-Verde rápido. C: cotiledones con núcleos teñidos de rojo. TCS: taninos en cubierta seminal. B) Semilla teñida con Vainillina. Aumento: 10 X, tomada por Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco.	37
8	Número de acodos que presentaron raíces o yemas en temporada de secas o lluvias. J. David Tellitud (Santa Rita), Huetamo de Núñez, Michoacán. N_{total} : 45 acodos, $N_{Abril\ 2006}$: 30 acodos, $N_{Julio\ 2006}$: 6 acodos, $N_{Enero\ 2007}$: 9 acodos	39
9	Número de estacas que presentaron brotes en las temporadas de lluvias y secas. Colectadas en J. David Tellitud (Santa Rita), Huetamo de Núñez, Michoacán. N_{total} : 103 estacas, $N_{Julio\ 2006}$: 12 estacas, $N_{Noviembre\ 2006}$: 36 estacas, $N_{Enero\ 2007}$: 55 estacas	40
10	Número de estacas que desarrollaron brotes en enero de 2007, al haberlas expuesto a diferentes concentraciones de Radix® y Aciggib®. El asterisco (*) muestra que el	41

	tratamiento de Radix [®] 3000 ppm fue superior al de Aciggib [®] 4%.	
11	Porcentaje de germinación de semillas de Copalche en medio de cultivo con y sin carbón activado. N _{Carbón activado} : 100 semillas, N _{Sin carbón activado} : 75 semillas.	42
12	Número de brotes de Copalche, cultivados en tubos de ensayo expuestos a diferentes concentraciones de BA: 0, 0.1, 0.2 y 0.4 mM.	43
13	Formación de brotes en dos tipos de recipientes: angosto (tubo de ensayo) y ancho (frasco) a las cuatro semanas del experimento. Los 29 frascos con 4 explantes cada uno presentó formación de brotes, en los tubos no hubo formación de brotes.	44
14	Porcentajes de elongación de explantes en tubo con medio semisólido (Villegas <i>et al.</i> , 1992) sin reguladores de crecimiento.	45
15	Número de frascos con explantes de Copalche que formaron hojas deformes, obtenidos de explantes provenientes de tratamientos con diferentes concentraciones de BA (0, 0.1, 0.2 y 0.4 mM).	47
16	Número de explantes de Copalche con hojas normales o sanas y con hojas deformes provenientes de subcultivo en medio sin hormonas.	47
17	Formación total de estructuras vegetales de Copalche <i>in vitro</i> con los tratamientos de AIB, AIA y BA a la quinta semana.	48
18	Promedios del número de brotes de Copalche en las semanas 2 y 3, obtenidos en medio de cultivo con los reguladores de crecimiento AIB, AIA y BA a las concentraciones de 0, 0.1, 0.2 y 0.4 mM.	49
19	Número de explantes de Copalche con formación de callo y raíz obtenidos la semana 5, utilizando los reguladores de crecimiento AIB, AIA y BA a las concentraciones de 0, 0.1, 0.2 y 0.4 mM.	51
20	Número de raíces formadas a la segunda semana.	52
21	Dinámica de emergencia de plántulas de Copalche sembradas el 12 enero 2007 y 10 marzo 2007. Colectadas en J. David Tellitud (Santa Rita), Huetamo de Núñez, Michoacán. N _{total} : 200, Edad: recién colectadas en temporada de secas: diciembre 2006 y febrero 2007.	53
22	Porcentaje de germinación de plántulas de Copalche sembradas en la temporada de secas de 2007, 12 enero y 10 marzo. Colectadas en J. David Tellitud (Santa Rita), Huetamo de Núñez, Michoacán. N _{total} : 200, Edad: recién colectadas en temporada de secas: diciembre 2006 y febrero 2007.	54

1. RESUMEN

Métodos de propagación de la planta medicinal copalche (*Hintonia latiflora*)

El Copalche (*Hintonia latiflora*) es un árbol empleado en la medicina tradicional desde tiempos inmemoriales en México, su corteza es utilizada para el tratamiento de diversas enfermedades como: afecciones gastrointestinales, úlceras y diabetes. El incremento de la demanda local y en el mercado de esta corteza ha producido una recolección intensiva de la misma y sus poblaciones naturales han disminuido, aunque la CONABIO no la reporta como especie amenazada.

Existen trabajos sobre los compuestos químicos de la corteza de *H. latiflora*, los cuales han mostrado resultados farmacológicos positivos en su actividad antipalúdica y contra la diabetes. Sin embargo no se han reportado trabajos sobre propagación de esta especie, por lo que el objetivo de esta tesis fue conocer el mejor método de propagación controlado para la obtención de nuevos individuos de Copalche. Se realizaron experimentos de propagación vegetativa y sexual: acodos, estacas, cultivo *in vitro* y germinación de semillas en suelo. Los resultados mostraron que en acodos y estacas no se obtuvo formación de raíces; en el cultivo *in vitro* se observó el surgimiento de brotes, sin embargo tampoco se propició el enraizamiento; en la emergencia de plántulas en suelo se presentó un porcentaje bajo de germinación, sin embargo en cultivo *in vitro* se presentó un porcentaje alto de germinación.

Con fundamento en los resultados de este trabajo, el Copalche (*Hintonia latiflora*) se puede considerar como una especie de difícil enraizamiento, sin embargo la mejor opción observada fue la germinación de semillas en suelo, ya que el cultivo *in vitro* puede ser una buena opción para germinación pero más costosa. Los resultados obtenidos en acodos, estacas y cultivo *in vitro* no cumplieron con el objetivo de formar raíces, sin embargo no se descarta la posibilidad de utilizar la propagación vegetativa como una herramienta para la obtención de nuevos individuos de esta especie.

2. INTRODUCCIÓN

En México como en muchos otros países, las plantas medicinales son empleadas como tratamiento alternativo para la curación de diferentes padecimientos, en los años 90's se sabía que aproximadamente 1500 millones de personas recurrían a medicinas y terapias tradicionales (Hersch, 1999). Los estudios etnobotánicos han permitido tener mayor conocimiento en relación con este tipo de plantas, también han permitido que se abra un campo de investigación sobre compuestos químicos que se presentan en medicinas de patente y en medicina tradicional.

Hintonia latiflora (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock (Copalche), es una planta de uso común en la zona de la Depresión del Balsas, más concreto en la zona de estudio J. David Tellitud (Santa Rita), Municipio de Huetamo de Núñez, Michoacán.

H. latiflora conocida en la región con el nombre de Copalche, es una planta arbórea silvestre de uso común en la zona de la Depresión del Balsas, cuya corteza se utiliza en medicina tradicional para diversas afecciones. El árbol de Copalche pertenece al grupo de las Quinas amarillas del complejo Quina en México, que se caracterizan por la amargura de su corteza y por su parecido morfológico con la *Cinchona pubescens* Vahl, planta originaria de Perú que no tiene distribución en México y que se utiliza para combatir al paludismo (Anaya Dávila-Gabiri, 1991). En la búsqueda de plantas que presentaran similitudes en las características de ésta, se encontró al Copalche (*H. latiflora*), cuya corteza ha sido utilizada tradicionalmente como medicina contra dolores estomacales y últimamente se le ha atribuido la propiedad de ser controladora de niveles de azúcares en sangre (diabetes) (Anaya Dávila-Gabiri, 1991; Aguilar *et al.*, 1994; Hersch, 1999; Márquez *et al.*, 1999; Bnouham *et al.*, 2006; Cristians *et al.*, 2009).

El incremento del uso de la corteza de Copalche ha producido la recolección intensiva de la especie. Debido a que, el descortezado del árbol no tiene control, los árboles de donde se colecta no logran regenerarla, este daño causa la muerte. Un problema adicional es la presencia de plagas en el follaje y las ramas, que se observan con manchas cafés y con perforaciones que secan el tejido.

En la revisión bibliográfica no se encontraron trabajos que hablen de la propagación de esta especie, por lo que este trabajo pretende encontrar los procedimientos de propagación que permitan la obtención de más plantas de Copalche, para ser reintroducidos a la zona de estudio y en los huertos familiares

3. ANTECEDENTES

3.1. Antecedentes botánicos

Las plantas medicinales se han utilizado durante mucho tiempo en nuestro país, situándolo como el segundo a nivel mundial en el uso de plantas medicinal después de China (Bye *et al.*, 1992).

En México existen diversas culturas que desde épocas prehispánicas tienen un amplio conocimiento de las plantas, este conocimiento generado desde tiempos inmemoriales es muy vasto y se ha transmitido de generación en generación desarrollándose a lo largo de todo el país.

La cosmovisión que se va formando es totalmente diferente de acuerdo al uso que se le otorga a la planta, por ejemplo, en el ámbito religioso muchas plantas forman parte central y fundamental del rito, ya que sin ellas no se puede realizar. En la medicina tradicional ocurre de una forma similar, las plantas son la parte central y envuelven todo el conocimiento de los pueblos que las utilizan, estas suelen cambiar de nombre de acuerdo a la región y también pueden cambiar los padecimientos que cura, pero generalmente se mantiene uno o dos similares, lo cual facilita su ubicación a lo largo del país (Bye *et al.*, 1992).

3.1.1. *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock

Es un árbol de hasta 5 m de alto, bisexual, perenne, se encuentra distribuido en climas cálido, semicálido, semiseco y templado, entre los 80 y los 2000 de altitud, se encuentra en bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña y bosque de pino-encino. Tiene ramas cinéreas, corto-pelosas o glabras, entrenudos cortos o alargados. Hojas caducifolias, simples, opuestas; con lámina ovada, oblonga, oval u ovado-oval, de 3.5-12 por 1.5-6 cm, redondeada hasta aguda en la base, por lo común abruptamente corto-decurrente, obtusa, aguda o abruptamente corto-acuminada en el ápice, verde vivo, concolor, glabra o esparcidamente corto-pelosa en el haz, en la venación plana, corto-pelosa o glabra en el envés, a menudo con grupos de tricomas blancos en las axilas de los nervios laterales, domacios, prominentes y arcuados, el margen plano; pecíolos delgado de 0.4 a 2 cm de largo; estípulas triangulares, de 2 a 4 mm de largo,

agudas o acuminadas, con glándula apical. Flores perfectas; axilares, solitarias, pedicelos de 1 a 2.5 cm de largo, bracteolados en la mitad o más bajo, bracteolas menudas, sublobuladas; hipanto glabro tubulados, de 1 a 2 cm de largo, corola blanca o verdosa en seco, de 6 a 8 cm de largo, tubo estrechamente obcónico, anguloso, ca. 3 cm de ancho en la garganta, lóbulos 6, plegado-imbricados, redondeado-ovados o semiorbiculares, ca. $\frac{1}{4}$ de largo que el tubo, estambres 6, iguales de largo o más cortos que la corola, anteras de 2 a 2.5 cm de largo. Fruto de cápsula obovada, aguda en la base, de 2 a 3 por 1.5 a 2 cm, ligeramente comprimida, 6-costada, lenticelada y finamente tuberculada, parda. Semillas ovales u orbiculares, de 4 a 7 mm de largo, pardas. La planta florece en febrero y marzo, llega a presentar una floración extemporánea en el mes de junio, las hojas están presentes entre los meses de febrero y octubre. Se distribuye a todo lo largo del territorio nacional. (Borhidi, 2006; Cristians Niizawa, 2009). (Figura 1)



Figura 1. Árbol de Copalche (*H. latiflora*) en el sitio de estudio cerca de las parcelas de cultivo de J. David Tellitud (Santa. Rita), Huetamo, Michoacán, (Julio 2006, A. L. Castañeda Huitrón).

3.1.1.1. Ubicación taxonómica

Ubicación taxonómica de acuerdo a <http://www.tropicos.org/> del Jardín Botánico de Missouri:

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Gentianales

Familia: Rubiaceae

Género: *Hintonia*

Especie: *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock

3.1.1.2. Nombre científico

Hintonia latiflora (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock (Icones Plantarum 33: t. 3295:4. 1935).

3.1.1.3. Sinonimias

Coutarea latiflora Sessé et Mociño ex DC (Prodomus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis 4: 350. 1830); *Coutarea pterosperma* (S. Watson) Standley (North American Flora 32: 127. 1921); *Portlandia pterosperma* S. Watson (Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences 24:52. 1889); *Portlandia hexandra* Jacq. (Enumeratio Systematica Plantarum 16. 1760) (Cristians Niizawa, 2009).

3.1.1.4. Nombres comunes

De acuerdo a la recopilación hecha por Cristians Niizawa (2009), los nombres comunes de *H. latiflora* son los siguientes:

Campanilla (Jalisco), campanillo, falsa quina (Chiapas), cascara sagrada, Chib'u'she (Sonora, Pima; Distrito Federal), chichicpatli (Náhuatl), copalchi, copalchi de Jojutla, copalche (Morelos), copalchile, copalquín, corteza de Jojutla, huetiyo (Sonora-Chihuahua,

Warahío), iwichuri (Chihuahua, Tarahumara), palo amargo, palo amargoso (Sinaloa), palo Copalche (Durango), palo de bolsa, Copalche (Michoacán), quina de Michoacán, quina, San Antonio, tacusisha (Nayarit, Cora), tapichogua (Sinaloa, Mayo), tyaacusjsixa´a (Nayarit, Cora), campanilla blanca (Puebla), y quina, copalchi, palo de quina, quina amarilla, Copalche (Guerrero) (Sahagún, 1540: Mociño, 1803; AIMN, 1984, Loeza, 1906, 1907, 1908: Landa, 1913; Terres, 1913; Gentry, 1942; Díaz, 1976, Bye, 1986; Martínez, 1989; Anaya Dávila-Gabiri, 1991; Aguilar *et al.*, 1994; Argueta *et al.*, 1994; Márquez *et al.*, 1999).

3.2. Propagación vegetativa

Los mecanismos por los cuales una planta puede reproducirse a partir de partes vegetativas, son: raíces, hojas, tallos, tubérculos, etc., se le llama propagación vegetativa o asexual. Este tipo de propagación es común en condiciones naturales y también es muy utilizado por el humano, ya que presenta una buena posibilidad de obtención de material vegetal rápidamente. Esencialmente implica seccionar una parte de la planta madre e inducir posteriormente la formación de raíces bajo condiciones controladas (Hartmann *et al.*, 1997).

Las plantas presentan muchas propiedades y características que las hacen ser especiales, unas de ellas es la desdiferenciación de algunas células (meristemáticas) y la totipotencialidad celular. Cuando los tejidos vegetales ya son maduros, sus células se encuentran diferenciadas; sin embargo, hay algunos tejidos que tienen la capacidad de desdiferenciarse y dar origen a otras estructuras; es decir, transforman sus células ya especializadas y diferenciadas a células meristemáticas o desdiferenciadas, logrando como resultado una modificación en sus funciones celulares (Hartmann *et al.*, 1997). Por otro lado, la totipotencialidad es la capacidad de un célula vegetal para reproducir todos los órganos de una planta y sus funciones, gracias a que porta la información genética necesaria (Taiz y Zeiger, 2002).

La propagación vegetativa se da en la naturaleza en diferentes circunstancias, un ejemplo son aquellas plantas cuyas ramas llegan al suelo y que teniendo las condiciones favorables, propician la producción de raíces en ellas, teniendo como resultado una planta nueva de

mayor talla. El humano basándose en esta propiedad, ha ideado variantes de este tipo de propagación, principalmente son tres:

1. Propagación por injerto de tejido vegetal sobre otra planta que sirva como receptora, ésta es más resistente y le da soporte a la planta injertada.
2. Micropropagación a partir de tejidos vegetales en cultivo *in vitro*.
3. Propagación a partir de estolones, rizomas, bulbos, tubérculos o segmentos de las plantas (estacas o acodos) que conserven capacidad para generar raíces (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

Una de las principales ventajas de la propagación vegetativa, es que permite la producción de plantas en menos tiempo, y se puede acortar el periodo de regeneración natural acortando las etapas de crecimiento (Hartmann *et al.*, 1997), los costos pueden variar, pero generalmente son bajos.

3.2.1. Acodos

Se le conoce a los acodos como la propagación a partir de partes aéreas de la planta (ramas), a los cuales se les interrumpe el flujo de componentes del floema a partir del corte en forma de anillado de la corteza, lo que propicia el crecimiento de raíces en esta zona, sin desprender la rama de la planta madre. En estas condiciones la rama sigue recibiendo nutrientes y agua, debido a que no se corta el xilema y además se acumulan fotosintatos, metabolitos secundarios y hormonas vegetales, en la zona superior del anillado. De esta forma, la interrupción que produce el anillado de la corteza en la rama acodada, estimula la formación de raíces. Este proceso se refuerza externamente al aplicar enraizador comercial que induce la formación de raíces adventicias (Rojas, 1987; Hartmann *et al.*, 1997).

3.2.2. Estacas

Una estaca es aquella porción de tallo o rama que se corta de la planta madre y logra enraizar. Generalmente contienen yemas laterales o adventicias, estas contribuyen a la formación de la nueva planta. El objetivo de este tipo de propagación es: obtener en corto tiempo una planta de cierta talla con raíces que le permitan sostenerse. Las raíces que se presentan en esta forma de propagación son adventicias y son aquellas que se desarrollan a partir de cualquier parte de la planta que no sean las raíces del embrión y sus ramas

(Hartmann *et al.*, 1997). Los factores genéticos, fisiológicos y fenológicos asociados a una planta, van a ser fundamentales para que esta produzca raíces mediante estacas (Iglesias *et al.*, 1996; Alegre *et al.*, 1998).

Para acodos y estacas se deben tomar en cuenta las características de la planta madre, como: que presente ramas sanas, crecimiento firme y erecto, factores genéticos, anatómicos o ambientales (Longman y Wilson, 1993), así como: la juvenilidad de las ramas, lo que facilitará la formación de las raíces adventicias y en qué temporada del año se hace la propagación, la cual se asocia con la acumulación de materiales de reserva de la planta.

Para incrementar el porcentaje de enraizamiento en estos tipos de propagación, se sugiere utilizar reguladores de crecimiento como: auxinas, citocininas y giberelinas; en solución o talco para acelerar la formación de raíces adventicias y que presenten mejor calidad y uniformidad (Hartmann *et al.*, 1997).

3.2.3. Cultivo *in vitro*

Consiste en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas (luz, humedad y temperatura) y químicas (nutrientes) apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana (Dodds y Roberts, 1982; Jiménez, 1998; Razdan, 2003).

La propagación *in vitro* de una planta requiere que ésta sea potencialmente capaz de regenerarse, lo cual está determinado por el genotipo, las condiciones ambientales y el estado de desarrollo de la planta. Las plantas jóvenes tienen mayor capacidad de regeneración que las plantas adultas (Phillips *et al.*, 1994). Esta respuesta se puede obtener al aplicar reguladores de crecimiento, los más frecuentes son las auxinas, las citocininas y las giberelinas, entre otros (Razdan, 2003).

En el cultivo *in vitro*, además de utilizar reguladores de crecimiento se pueden utilizar otros agentes que ayuden a obtener el resultado deseado como: complejos naturales (endospermo de coco, etc.), vitaminas, medios de soporte entre otros. Uno de los agentes más utilizados son los agentes antioxidantes como el carbón activado, que se utiliza para: evitar la

oxidación, eliminación de compuestos fenólicos y reacciones de oxido-reducción (Redox) (González *et al.*, 2000).

El uso de estos agentes nutritivos, hormonales o antioxidantes depende del objetivo del proyecto.

3.2.3.1. Auxinas

Son reguladores de crecimiento asociados a diferentes procesos en las plantas, algunos son la división celular y la organización de meristemos, eleva la desorganización de los tejidos por ejemplo en los callos, o diferenciando órganos como las raíces. Cuando los tejidos ya están organizados, las auxinas son un elemento que ayuda a la dominancia apical, promueve el crecimiento de raíces, inhiben la abscisión, retrasan la senescencia de las hojas y la maduración del fruto (Gaspar *et al.*, 1996). En cultivo de tejidos induce la formación de raíces a partir de brotes. (Gaspar *et al.*, 1996; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998).

Algunas de las auxinas más utilizadas para promover la formación de raíces en acodos, estacas y cultivo *in vitro* son: ácido indolacético (AIA), el ácido indolbutírico (AIB) y el ácido naftalenacético (ANA) (Salisbury y Ross, 1994).

Una de las formas comerciales de auxinas, empleadas para formación de raíces en esquejes o estacas y acodos es el Radrix®, el cual se comercializa como Radix 1500 recomendado para especies herbáceas y Radix 10000 recomendado para especies de tallo duro y leñoso de difícil o lento enraizamiento. Existen varios trabajos en donde se han obtenido resultados favorables de enraizamiento con especies leñosas como el Cuachalalate (Cid de la Torre, 2008) con diluciones de 3000 y 6000 ppm.

3.2.3.2. Citocininas

En condiciones naturales promueven el crecimiento de las yemas laterales y la expansión de las hojas, retardan la senescencia, degradación de clorofila y el desarrollo de cloroplastos (Gaspar *et al.*, 1996). En cultivo de tejidos estimula la división celular, la activación de yemas laterales y la formación de yemas adventicias (Malda *et al.*, 1999; Razdan, 2003).

De las citocininas más utilizadas están: cinetina, bencilaminopurina (BAP o BA) y 2-isopenteniladenina (2iP).

3.2.3.3. Giberelinas

Son importantes en condiciones naturales, ya que promueven el crecimiento y desarrollo de los entrenudos, regulan las fases juveniles a adultas, ayudan a la iniciación floral y su determinación sexual, promueven la formación de frutos y partenocarpia, y rompe la dormancia de yemas y semillas. En cultivo *in vitro* promueve la germinación, formación de brotes y callos, e inhibe la embriogénesis somática en etapas tempranas (Razdan, 2003).

Las giberelinas más usadas son: el ácido giberélico (GA₃), las GA₇ GA₁ y el ESTIVAL que es producido sintéticamente.

Generalmente las auxinas y las citocininas se utilizan juntas en cultivo *in vitro*, por lo que su concentración debe ser controlada, ya que altas concentraciones de auxinas provocan la formación de raíces, mientras que altas concentraciones de citocininas inducen la formación de brotes, concentraciones medias de ambas provocan la formación de brotes y raíces, incluso la adición de giberelinas debe estar coordinada con la concentración de los otros reguladores de crecimiento (Gaspar *et al.*, 1996; Razdan, 2003). De acuerdo al objetivo que tenga el estudio es la concentración de reguladores de crecimiento que se utilizará y si hay una combinación de estos. Su uso en otro tipo de propagación como los acodos y las estacas también está íntimamente ligado con el objetivo del trabajo.

3.3. Propagación Sexual

La reproducción o propagación sexual es aquella que se da mediante germinación de semillas, de esta forma se obtienen plantas con variabilidad genética; este tipo de características permiten que las plantas afronten dificultades o características del medio en el que se encuentran (Duran-García *et al.*, 1997). La reproducción sexual tiene ventajas como la carga genética en sus poblaciones, sin embargo también tiene desventajas como la variabilidad y latencia de las semillas, así como su producción durante el año (Corner, 1976).

3.3.1. Germinación

Se define como una etapa del ciclo de vida de una planta, es considerada como el inicio del crecimiento del embrión de una semilla madura, así mismo es la suma de eventos consecutivos que inicia con la hidratación de las semillas y termina con la emergencia del eje embrionario (Taiz y Zeiger, 2002, Srivastava, 2002).

La germinación puede verse afectada por diversos factores: ambientales, intrínsecos de la semilla (fisiológicos, químicos, etc.), edad de la planta madre, posición de las semillas en el fruto, latencia de las semillas, medio en el que germina, humedad, radiación solar, entre otros. (Khan, 1982).

Khan (1982), menciona que si las condiciones óptimas para la germinación se proveen el proceso de germinación debe ser exitoso, pero que si esto no sucede, se puede deber a dos factores: que la semilla no es viable o que si lo es pero está latente.

Generalmente las semillas contienen todos los nutrientes necesarios para la germinación y crecimiento, la madurez o inmadurez del embrión también es un factor que contribuye para iniciar el proceso de germinación. Para que se inicie este proceso primero se necesita que la semilla encuentre las condiciones de temperatura, agua y oxígeno, inicia la germinación (Srivastava, 2002).

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que *Hintonia latiflora* (Copalche), es una planta que se usa en la medicina tradicional para diversos padecimientos y su demanda se ha incrementando, se proponen ensayar diversos métodos de propagación para la obtención de nuevas plantas y seguir utilizando el recurso, sin acabar con las poblaciones existentes

5. OBJETIVOS: GENERAL Y PARTICULARES

EL objetivo general de este trabajo es conocer el mejor método de propagación controlado para la obtención de nuevas plantas de *Hintonia latiflora* (Copalche).

Objetivos particulares:

- Determinar si existen diferencias en la temporada del año para la realizan acodos y estacas.
- Reconocer las mejores concentraciones de ácido indol butírico (AIB) y ácido giberélico (GA) en el enraizamiento de acodos y estacas.
- Evaluar la eficacia del cultivo *in vitro*, como una técnica para la propagación vegetativa de Copalche.
- Evaluar el efecto de auxinas (AIB y AIA) y citocininas (BA) en la inducción de brotes y raíces a través de cultivo *in vitro*.
- Evaluar la respuesta germinativa en enero y marzo 2007 de semillas colectadas en diciembre 2006 y febrero 2007 respectivamente.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1. Sitio de estudio

El presente trabajo se realizó en la localidad de J. David Tellitud (Santa Rita), Huetamo de Núñez (Figura.2), Michoacán $18^{\circ} 31.709' N$ $101^{\circ} 04.692' W$, la cual se encuentra en la Depresión del Balsas a una altura de 221 metros.

La zona de estudio se caracteriza por presentar regiones semiconservadas y conservadas de Bosque Bajo Caducifolio (BBC), sin embargo hay grandes extensiones de tierra que se utilizan para prácticas agrícolas y ganaderas.



Figura 2. Localización del municipio de Huetamo de Núñez, en el Estado de Michoacán, México.

6.2. Sitio de trabajo

Los experimentos se realizaron *in situ* en la localidad de J. David Tellitud (Santa Rita), Huetamo, Michoacán, en el Laboratorio de Fisiología y Estructura de Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM y en el Laboratorio de Cultivo *in vitro*, Programa de Fruticultura, PIREGEP-Campus Montecillo, Colegio de Posgraduados.

6.3. Material vegetal

Los árboles de Copalche de Sta. Rita miden de 5 a 7 m de altura, su corteza es delgada, de color grisáceo. Tiene hojas ovadas y vellosas pubescentes en el reverso, los frutos son café

en forma de cápsula y costilludos. Las semillas son diminutas y ovales, de color amarillo y de 5-7 mm de largo. Florece de mayo a junio y fructifica julio a enero. Está presente en lugares secos, rocosos y de suelo poco profundo, principalmente en selva tropical caducifolia (Barajas-Morales y León, 1989; Borhidi, 2004; Márquez *et al.*, 1999), que corresponde a Bosque Bajo Caducifolio (Rzedowski, 1994) (Figura. 3).



Figura 3. Árbol de Copalche (*H. latiflora*) en el sitio de estudio cerca de las parcelas de cultivo de J. David Tellitud (Santa. Rita), Huetamo, Michoacán, (Julio 2006, A. L. Castañeda Huitrón).

Su uso es diverso, desde leña para el hogar, postes para delimitar parcelas y usos medicinales, entre los cuales destaca; contra la diabetes (Aguilar *et al.*, 1994; Márquez *et al.*, 1999), el paludismo, para curar heridas, llagas, dolores gastrointestinales, entre otras. La parte reportada más usada es la corteza (Hersch, 1999), por lo que los árboles llegan a morir si no se deja que se regenere o porque la extracción de la misma se realiza en todo el tronco del árbol.

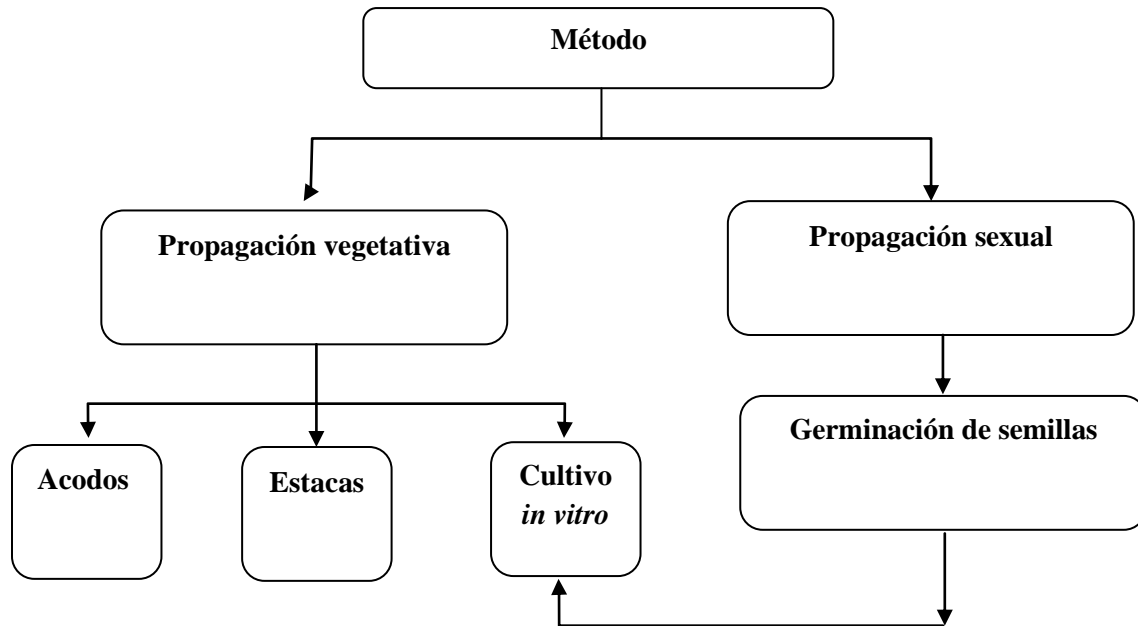
El material utilizado se recolectó estudio en diferentes épocas del año: ramas para acodos (*in situ*), ramas para estacas y frutos colectados del árbol.

Descripción del Fruto. Se hizo la caracterización de los frutos que se recolectaron en febrero de 2007, Se registraron los siguientes datos: largo y ancho del fruto (cm), tamaño

de las semillas (cm), número de semillas por fruto. Se procesaron algunas para su análisis anatómico

6.4. Planeación del método general

El método se dividió en dos vertientes principales: propagación vegetativa y propagación sexual.



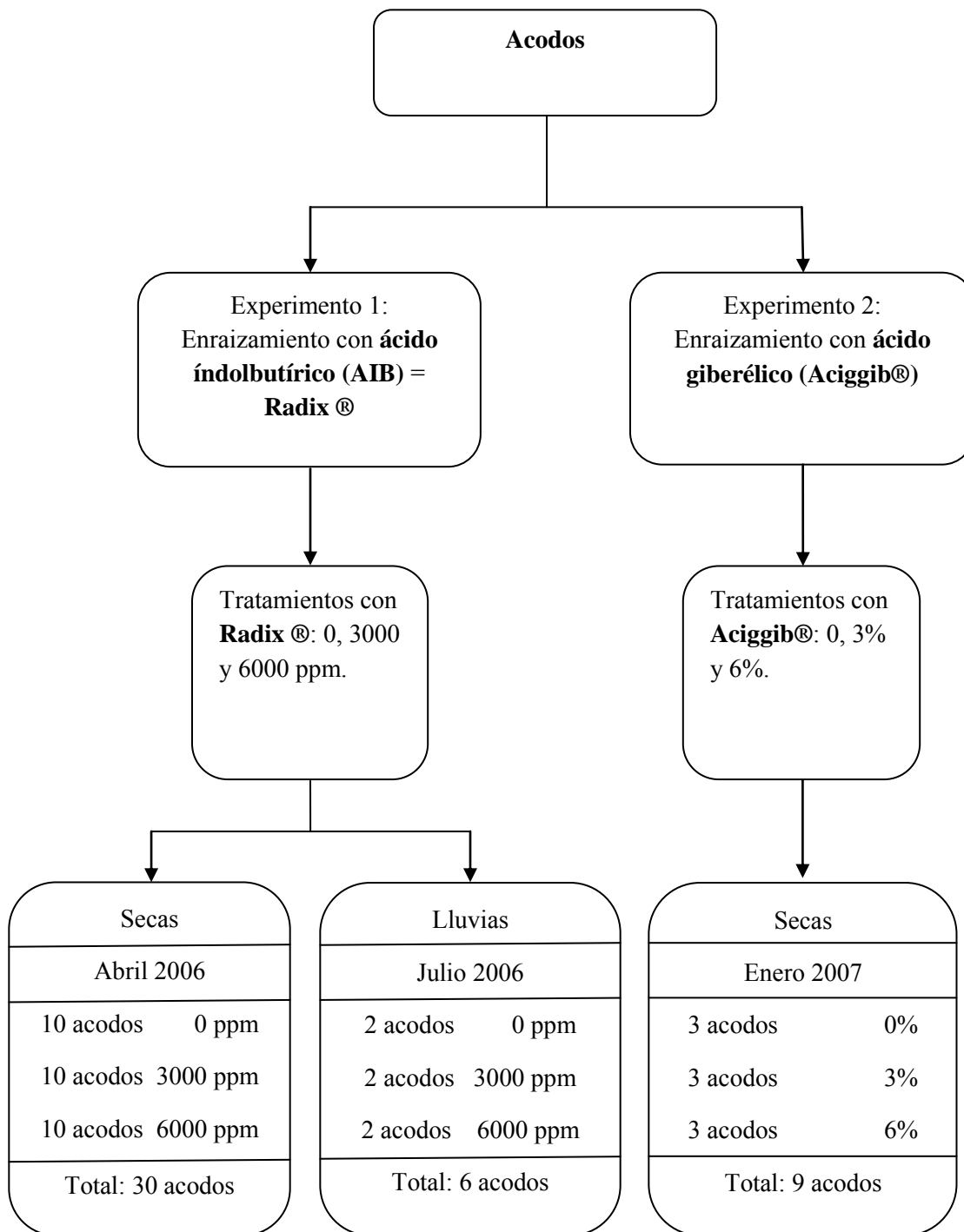
6.5. Propagación vegetativa

El estudio se llevó a cabo entre abril de 2006 y junio de 2008, periodo durante el cual se realizaron experimentos de acodado *in situ*, estacado *ex situ* y cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

Para los acodos y estacas se seleccionaron individuos adultos que presentaron mejor apariencia como: follaje abundante, corteza uniforme o sin cortes recientes y con una altura media.

6.5.1. Acodos

6.5.1.1. Planeación de los experimentos de Acodos



6.5.1.2. Experimento 1

Con el fin de conocer la capacidad de enraizamiento de las ramas de Copalche se procedió a realizar propagación por acodos en secas y lluvias. Se evaluó el enraizamiento de acodos con ácido indolbutírico (AIB) con diferente concentración del enraizador comercial Radix[®]. Considerando que el Copalche es una especie leñosa y que se han obtenido resultados favorables con diluciones de 3000 y 6000 ppm en especies leñosas como el Cuachalalate se probaron estas mismas concentraciones en el presente trabajo.

6.5.1.2.1. Conducción del experimento

Se trabajó con 4 árboles de Copalche del sitio de estudio, de los cuales se seleccionaron ramas de apariencia sana, tallo recto y de 2 cm diámetro aproximadamente. A las ramas se les hizo un anillado, retirando aproximadamente dos centímetros de corteza en el perímetro de la rama.

Los tratamientos con enraizador fueron los siguientes: 0 (testigo) y dos concentraciones Radix[®] a 3000 y 6000 ppm. Para mantener la humedad del anillado, cada acodo se cubrió con peat moss húmedo y se envolvió con una bolsa de plástico (Figura. 4). Para cada tratamiento se hicieron las siguientes repeticiones:

Secas: Radix[®] 3 concentraciones x 10 repeticiones = 30 acodos

Lluvia: Radix[®] 3 concentraciones x 2 repeticiones = 6 acodos

Después de tres meses se registró el número de acodos que presentaron raíces.

6.5.1.2.2. Análisis de datos

Análisis estadístico con los resultados por tratamiento, para determinar la mejor concentración y época del año que promoviera formación de raíces.

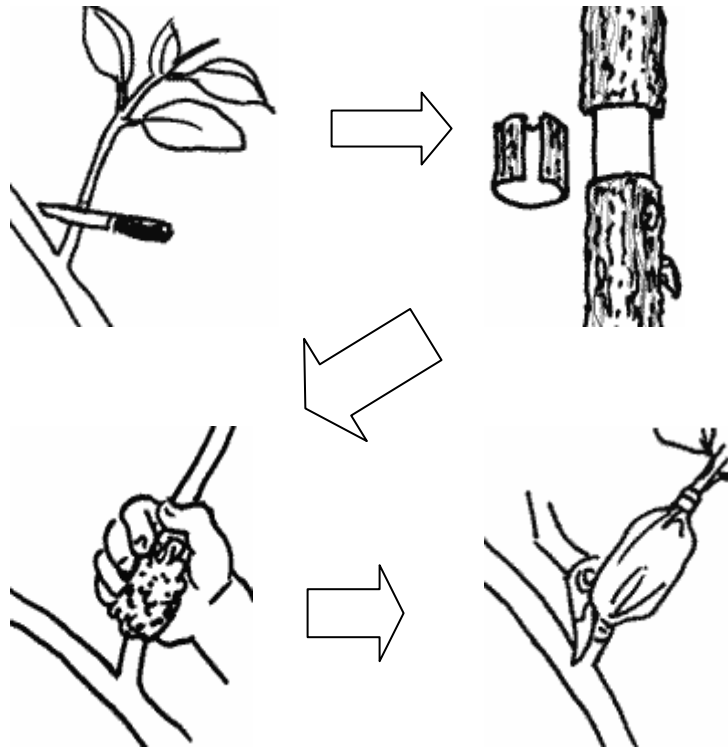


Figura 4. Esquema del procedimiento de acodado. Imagen tomada de <http://articulos.infojardin.com/arboles/acodo-acodos-aereo-arboles.htm>

6.5.1.3. Experimento 2

Se probó el ácido giberélico (Aciggib[®], con ácido giberélico al 10%) como segunda opción para promover la formación de raíces en temporada de secas.

6.5.1.3.1. Conducción del experimento

Se utilizaron diferentes ramas de los 4 árboles de Copalche del primer experimento.

Se siguió el procedimiento de acodado ya descrito en el experimento 1, y una vez retirada la corteza se colocaron las tres concentraciones de los tratamientos de ácido giberélico (Aciggib[®]): 0 (testigo), 3% y 6%.

Se hicieron tres repeticiones para cada concentración de Aciggib[®]

Secas: Aciggib[®] 3 concentraciones x 3 repeticiones = 9 acodos

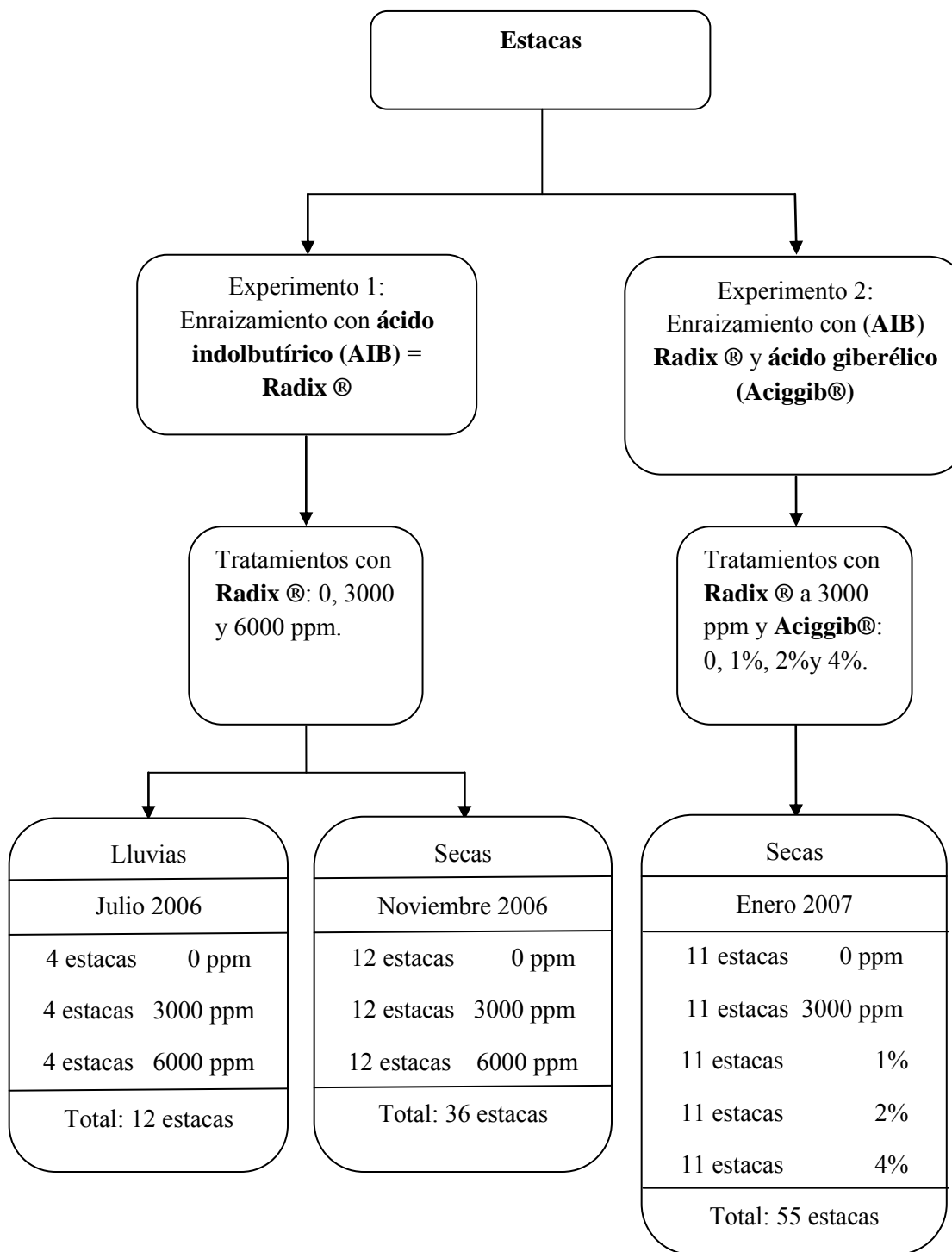
Después de tres meses se registró el número de acodos que presentaron raíces.

6.5.1.3.2. Análisis de datos

Análisis estadístico con los resultados por tratamiento, para determinar la mejor concentración que promoviera formación de raíces.

6.5.2. Estacas

6.5.2.1. Planeación de los experimentos de Estacas



6.5.2.2. Experimento 1

Para conocer la capacidad de enraizamiento de ramas de Copalche se realizó la propagación por estacas. Se evaluó el enraizamiento de estacas en verano y en otoño con diferentes concentraciones de Radix®.

6.5.2.2.1. Conducción del experimento

Se trabajó con 4 árboles de Copalche del sitio de estudio, a los cuales se les seleccionaron ramas de apariencia sana, 4 metros altura aproximadamente, tallo recto y un diámetro de 2 cm aproximadamente. Se cortaron las ramas, se les removieron las ramas laterales y se trasladaron húmedas hacia el invernadero de la Facultad de Ciencias, UNAM, donde se sembraron.

La siembra se realizó durante la semana siguiente a la colecta: primero se lavaron y desinfectaron con fungicida Captán (0.2% = 2 grs. x litro), se enjuagaron y se les hizo 2 o 3 incisiones longitudinales a cada estaca (Brechú Franco, 2008).

Posteriormente se aplicaron los tratamientos de enraizador: 0 y dos concentraciones de Radix® a 3000 y 6000 ppm. Para cada tratamiento se hicieron las siguientes repeticiones:

Lluvia: Radix® 3 concentraciones x 4 repeticiones = 12 estacas

Secas: Radix® 3 concentraciones x 12 repeticiones = 36 estacas

Se colocaron en macetas con sustrato y dentro de un bolsa de plástico para mantener la humedad (Brechú Franco, 2008), todas manteniéndose en condiciones controladas de invernadero (Figura.5).

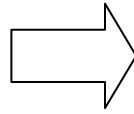
Después de tres meses se registró el número de estacas que presentaron raíces.

6.5.2.2.2. Análisis de datos

Análisis estadístico con los resultados por tratamiento, para determinar la mejor concentración y época del año que promoviera formación de raíces.



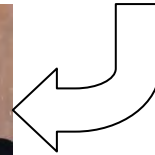
Corte de ramas



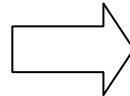
Desinfección



Enjuagado



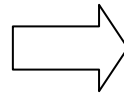
Incisiones



Aplicación de tratamientos



Enterrar en sustrato



Poner una bolsa para mantener humedad

Figura 5. Procedimiento de estacado: corte de ramas con tamaño uniforme, desinfectado y enjuagado, incisiones en la base de la estaca para la aplicación de tratamiento, enterrar en sustrato y poner una bolsa de plástico para mantener la humedad, (Brechú Franco, 2008).

6.5.2.3. Experimento 2

Se probó el ácido giberélico Aciggib[®] (con ácido giberélico al 10%) como segunda opción para promover el surgimiento de raíces y una concentración de auxina AIB usando Radix[®].

6.5.2.3.1. Conducción del experimento

Se siguió el procedimiento de estacado ya descrito en el experimento 1, y se colocaron los tratamientos de los enraizadores: 0, Radix[®] a 3000 ppm, ácido giberélico (Aciggib[®]), 1%, 2% y 4%.

Se hicieron repeticiones para la concentración de Radix[®] y de Aciggib[®] en la temporada de secas (total 55 estacas):

Testigo x 11 repeticiones = 11 estacas

Radix[®] 3000 ppm x 11 repeticiones = 11 estacas

Aciggib[®] 3 concentraciones x 11 repeticiones = 33 estacas

Después de tres meses se registró el número de estacas que presentaron raíces.

6.5.2.3.2. Análisis de datos

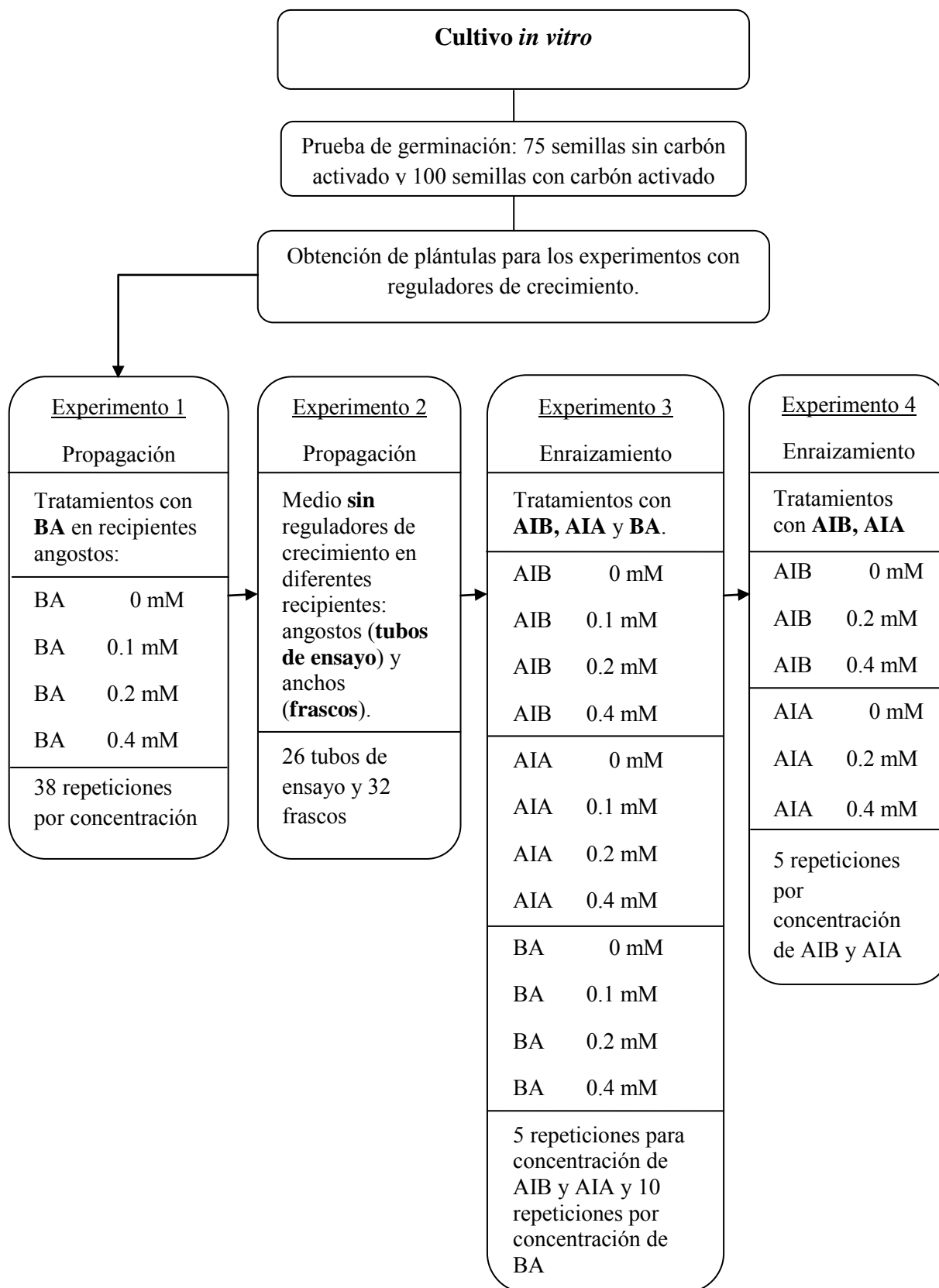
Análisis estadístico con los resultados por tratamiento, para determinar la mejor concentración que promoviera formación de raíces.

6.5.3. Cultivo de tejidos vegetales (Cultivo *in vitro*)

Se recurrió a la técnica de cultivo de tejidos vegetales como una opción de propagación vegetativa. Se tomó como fuente de explantes a las semillas de *H. latiflora* que contenían embriones, ya que se logró recolectar frutos cerrados, susceptibles de ser sometidos a desinfección, de los cuales se podían obtener las semillas en condiciones asépticas.

Se realizó el siguiente procedimiento:

6.5.3.1. Planeación de los experimentos del Cultivo in vitro



6.5.3.2. Prueba de Germinación

Para obtener plantas sanas se procedió a hacer una prueba de germinación de semillas en medio de cultivo *in vitro*. Se registró el porcentaje de germinación para la obtención de plantas para futuros experimentos.

6.5.3.2.1. Conducción del experimento

Se trabajó con frutos colectados el 20 de enero de 2007, los cuales fueron trasladados al Laboratorio de Cultivo *in vitro*, Programa de Fruticultura, PIREGEP-Campus Montecillo, Colegio de Posgraduados y se inició el procedimiento el 08 de febrero de 2007.

Se prosiguió con un protocolo de desinfección de frutos, de siembra de semillas y desarrollo de plántulas.

Desinfección de frutos:

- Los frutos se lavaron con jabón en 500 ml de agua manteniéndolos en agitación por 10 minutos y se enjuagaron con agua esterilizada tres veces para quitar todo residuo de jabón. Posteriormente se desinfectaron con una mezcla de fungicida (Captan 500) 1g/L, más bactericida (Agry-Gent Plus 800) 1g/L, ambos disueltos en el mismo litro de agua. Los frutos se mantuvieron en agitación en esta solución por 10 minutos; posteriormente se enjuagaron con agua esterilizada.
- Se les aplicó un baño de alcohol al 70% con agua estéril por 10 minutos. Por último en cloro al 30% con agua estéril en agitación por 15 minutos.
- Una vez terminado el tren de desinfección, los frutos se llevaron a la campana de flujo laminar, en donde se conservó un ambiente limpio y aséptico.

Siembra de las semillas extraídas de los frutos:

En la campana de flujo laminar se extrajeron las semillas de los frutos mediante instrumental estéril y una vez fuera se colocaron en el medio correspondiente.

La siembra se realizó en un medio semisólido propuesto por Villegas *et al.* (1992), colocando 25 ml en cajas Petri con dos modalidades: 4 con carbón activado y 3 sin carbón

activado. En cada caja se colocaron 25 semillas (explantes) con apariencia madura, conteniendo embrión denso, elegidas aleatoriamente de los frutos previamente desinfectados.

Medio semisólido + carbón activado: $4 \times 25 = 100$ semillas

Medio semisólido sin carbón activado: $3 \times 25 = 75$ semillas

Toda siembra de explantes, ya sean semillas u otro material vegetal siempre se realizó en la campana de flujo laminar, en un medio aséptico, limpio y estéril.

Una vez realizada la siembra se sellaron las cajas con plástico adherente, se colocaron en la cámara de incubación a 25 °C y 16 horas de luz, donde permanecieron para su observación y evaluación

6.5.3.2.2. Análisis de datos

Se registró el porcentaje de germinación que presentaron las cajas con medio de cultivo.

6.5.3.3. Experimento 1: Efecto de la benciladenina (BA) en la propagación *in vitro* de Copalche

Se inició un experimento de propagación a partir de plántulas de Copalche, utilizando la citocinina benciladenina (BA).

6.5.3.3.1. Conducción del experimento

Se trabajó con la parte aérea de las plántulas obtenidas de la prueba de germinación; la raíz no se utilizó. Cada explante correspondió a dos entrenudos y se uniformaron así los explantes para cada tratamiento. Como medio de inducción de brotes se utilizó medio semisólido (Villegas *et al.*, 1992) adicionado con BA a diferentes concentraciones: 0, 0.1, 0.2 y 0.4 mM, dando en total 4 tratamientos con 38 repeticiones cada uno. El medio se colocó en tubos de ensayo con 10 ml en cada uno: un explante por tubo de ensayo.

Tratamientos	Concentración	Número de repeticiones (tubos de ensayo)
1	0 mM	38
2	0.1 mM	38
3	0.2 mM	38
4	0.4 mM	38

Después de dos semanas se evaluó la emergencia de brotes para cada explante y tratamiento.

6.5.3.3.2. Análisis de datos

Se registró el número de brotes de cada tratamiento.

Se hicieron análisis estadísticos para determinar el mejor tratamiento en relación con la emergencia de brotes y cuál concentración convenía utilizar.

6.5.3.4. Experimento 2: Efecto de dos tipos de recipientes: angostos (tubos de ensayo) y anchos (frascos) sobre la propagación *in vitro* de Copalche en medio sin reguladores de crecimiento

Se evaluó si dos tipos de recipientes uno angosto y uno ancho, afectaba la respuesta de formación de brotes, para lo cual se hicieron subcultivos en tubos de ensayo y frascos, en medio semisólido (Villegas *et al.*, 1992), sin reguladores de crecimiento.

6.5.3.4.1. Conducción del experimento

Se mantuvieron en recipientes angostos (tubo de ensayo) 26 explantes del tratamiento 1 (testigo) del experimento anterior. A su vez, se subcultivaron en medio sin reguladores de crecimiento y en recipientes anchos (frascos), 128 explantes provenientes de los explantes restantes del tratamiento 1 y los explantes de los tratamientos 2, 3 y 4, del experimento anterior. En total se utilizaron 26 tubos de ensayo y 32 frascos:

Tratamiento 1 = 26 tubos de ensayo con 1 explante c/u = 26 explantes

Tratamiento 2 = 32 frascos con cuatro explantes c/u = 128 explantes

Después de cuatro semanas se evaluó la emergencia de brotes.

6.5.3.4.2. Análisis de datos

Se registró el número de brotes de cada recipiente a las cuatro semanas.

Se hicieron análisis estadísticos con los resultados obtenidos en la revisión de los frascos y si el tratamiento previo tenía relación con la emergencia de brotes y cuál concentración convenía utilizar posteriormente.

6.5.3.5. Experimento 3: Efecto de los reguladores de crecimiento AIB, AIA y BA, en el enraizamiento *in vitro* de Copalche

Se comparó la respuesta de surgimiento de brotes y enraizamiento con dos auxinas AIA (ácido indolacético) AIB (ácido indolbutírico) a tres concentraciones y con la citocinina BA a tres concentraciones.

6.5.3.5.1. Conducción del experimento

Se utilizaron explantes propagados del experimento 2, que se subcultivaron en medio semisólido (Villegas *et al.*, 1992) con diferentes concentraciones de tres reguladores de crecimiento: AIA, AIB y BA cada una en tres concentraciones y con las siguientes repeticiones:

Regulador de crecimiento	Concentración	Repeticiones
AIB	0 mM	5
AIB	0.1 mM	5
AIB	0.2 mM	5
AIB	0.4 mM	5
AIA	0 mM	5
AIA	0.1 mM	5
AIA	0.2 mM	5
AIA	0.4 mM	5
BA	0 mM	10
BA	0.1 mM	10
BA	0.2 mM	10
BA	0.4 mM	10

Cada repetición contenía 4 explantes, dando un total de 320 explantes.

6.5.3.5.2. Análisis de datos

Se registró el número de brotes y raíces de cada recipiente.

Se hicieron análisis estadísticos con los resultados obtenidos.

6.5.3.6. Experimento 4: Efecto de los reguladores de crecimiento AIB y AIA en el enraizamiento *in vitro* de Copalche

Se comparó la respuesta de surgimiento de raíces con los reguladores de crecimiento AIA y AIB a tres concentraciones.

6.5.3.6.1. Conducción del experimento

Se utilizaron explantes del experimento 3, que se subcultivaron en medio semisólido (Villegas *et al.*, 1992) con diferentes concentraciones de dos reguladores de crecimiento: AIA y AIB a tres concentraciones y con las siguientes repeticiones:

Regulador de crecimiento	Concentración	Repeticiones
AIB y AIA	0 mM	5
AIB	0.2 mM	5
AIB	0.4 mM	5
AIB	0.8 mM	5
AIA	0.2 mM	5
AIA	0.4 mM	5
AIA	0.8 mM	5

6.5.3.6.2. Análisis de datos

Se registró el desarrollo de raíces en los explantes o de alguna otra estructura (callo o brote).

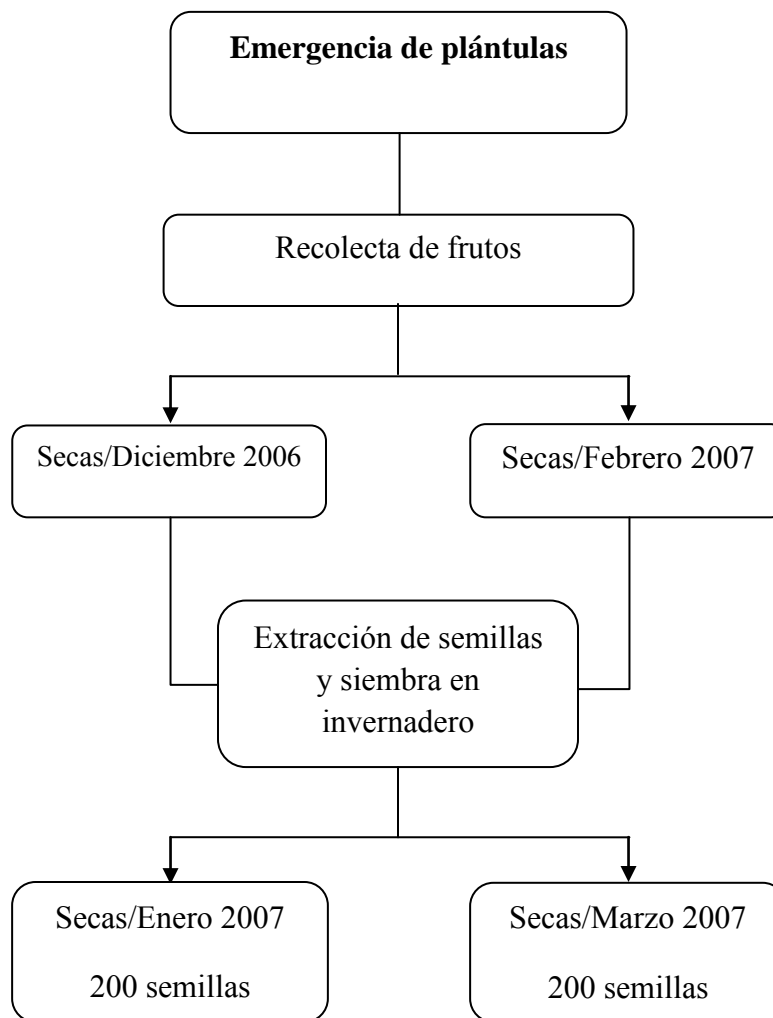
Se hicieron análisis estadísticos con los resultados obtenidos.

6.6. Propagación Sexual: Emergencia de plántulas

El estudio de emergencia de plántulas se llevó a cabo entre enero y marzo de 2007.

Se colectaron frutos de apariencia sana y se realizó la siembra de las semillas en el Invernadero de la Facultad de Ciencias, UNAM.

6.6.1. Planeación del experimento de emergencia de plántulas



6.6.2. Experimento de emergencia de plántulas

Con el fin de conocer la capacidad de respuesta de las semillas de Copalche en sustrato, se evaluó la emergencia de plántulas de frutos maduros colectados temporada de secas.

6.6.2.1. Conducción del experimento

Se colectaron frutos directamente de árboles de Copalche en la temporada de secas (diciembre 2006 y febrero 2007). Estos se llevaron al invernadero de la Facultad de Ciencias, UNAM, en dónde se les desinfectó con fungicida Captán® (0.2% = 2 grs. x litro), se enjuagaron con agua corriente (Brechú Franco, 2008) y posteriormente se extrajeron las semillas.

Se sembraron en enero y marzo de 2007 en recipientes de plástico transparente, perforados en la base (cuatro perforaciones) que contenían una capa de arena fina, Peat moss cernido y húmedo, en seguida se colocaron 20 semillas por recipiente y se les cubrió con una capa delgada de Peat moss cernido y húmedo. Los recipientes se cerraron para mantener condiciones de alta humedad.

Siembra:

Secas/12 Enero 2007 = 200 semillas

Secas/10 Marzo 2007 = 200 semillas.

Se registró semanalmente la emergencia de plántulas.

6.6.2.2. Análisis de datos

Aplicar análisis estadístico con los resultados por tratamiento, para determinar el mejor tiempo en la temporada de secas para la emergencia de plántulas. A los porcentajes se les aplicó una transformación arcosenica ($\arcsen\sqrt{x/100}$).

7. RESULTADOS

7.1. Descripción de fruto y semilla de *Hintonia latiflora*

Los frutos del sitio de colecta concordaron con la descripción de Niembro (1989), Borhidi (2006) y Cristians (2009). Presentaron una forma de cápsula obovada aguda en la base, de 2.3-2.5 cm por 1.3-1.8 cm, ligeramente comprimida, 6-costada, lenticelada, de color café oscuro (Figura 6: A-B). Al abrirlos se observó una cubierta dura que protegía de 4 a 6 hileras de semillas, las cuales estaban dispuestas en forma sobrelapada (Figura 6: C-D), cada fruto contenía de 36 a 100 semillas aproximadamente, dependiendo del tamaño del fruto. Las semillas mostraron forma ovalada de color amarillo claro de 5-7 mm por 6-8 mm; presenta cubierta seminal membranosa expandida; el embrión recto, espatulado, provisto de dos cotiledones planos, delgados y ovoides; endospermo abundante (Figura 6: E).



Figura 6. Fotografías del fruto y de la semilla de *H. latiflora*, tomadas por la M. en F. Ana Isabel Bieler Antolín. A-B: cápsula obovada aguda en la base, 6-costada, lenticelada, de color café oscuro; C-D: cubierta que protege las hileras de semillas; E: semilla con cotiledones (c) y embrión (e).

Se realizaron ensayos con cortes histológicos de algunas semillas de *H. latiflora*, y se les aplicaron dos tinciones para observar su contenido celular: 1) con la tinción safranina-verde rápido se observaron, principalmente cotiledones y endospermo y 2) con la tinción de vainillina, se observó la presencia de taninos en el ala de la semilla (Figura.7).

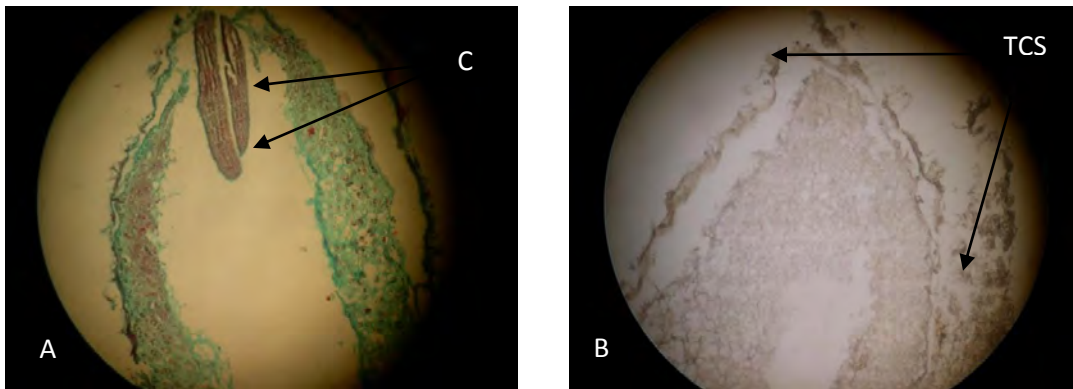


Figura 7. Fotografías de las semillas con dos tipos de tinciones: A) Semilla teñida con Safranina-Verde rápido. C: cotiledones con núcleos teñidos de rojo. TCS: taninos en cubierta seminal. B) Semilla teñida con Vainillina. Aumento: 10 X, tomada por Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco.

7.2. Propagación vegetativa

7.2.1. Acodos

7.2.1.1. Experimentos 1 y 2

- 1) Para conocer la capacidad de enraizamiento de Copalche mediante acodos, estos se realizaron en dos temporadas del año (secas y lluvias) con diferentes concentraciones de Radix[®] (0, 3000 y 6000 ppm):
 - a) Acodos hechos en primavera y revisados a los 3 meses: de los 30 acodos realizados se descartaron 11, por que se encontraron solo las bosas, estaban rotos o las ramas las habían cortado completamente. En los 19 acodos que permanecieron durante los tres meses, no se desarrollaron de raíces, sin embargo en 10 se presentó la formación de yemas (53%). En el anillado se observó un engrosamiento y alrededor del anillado se encontró gran cantidad de yemas.
 - b) Acodos hechos en verano y revisados a los 3 mese: de los 6 acodos realizados en lluvias, todos permanecieron pero se encontró que no formaron raíces ni yemas.
- 2) Experimento 2: se utilizaron diferentes concentraciones de ácido giberélico (Aciggib[®]: (0, 3% y 6%), y los acodos se realizaron en la temporada de secas; sin embargo, el cambio de enraizador no influyó el crecimiento de raíces, ya que ningún acodo las presentó (Figura 8).

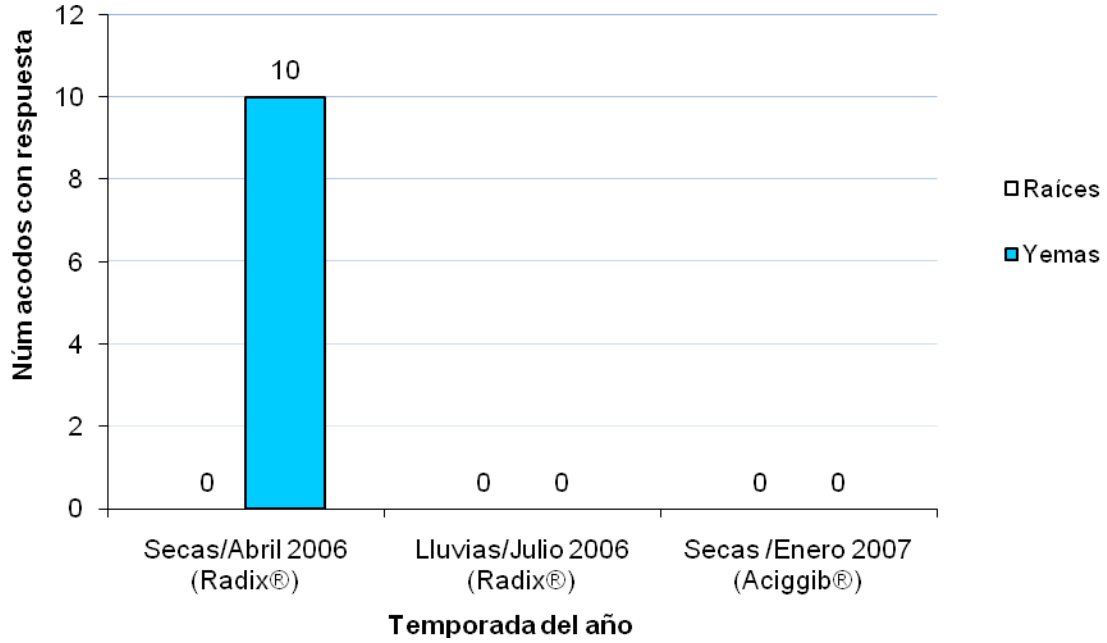


Figura 8. Número de acodos que presentaron raíces o yemas en temporada de secas o lluvias. J. David Tellitud (Santa Rita), Huetamo de Núñez, Michoacán. N_{total} : 45 acodos, $N_{Abril\ 2006}$: 30 acodos, $N_{Julio\ 2006}$: 6 acodos, $N_{Enero\ 2007}$: 9 acodos

Al no obtener formación de raíces en ninguno de los dos experimentos, no fue necesario realizar el análisis estadístico.

7.2.2. Estacas

7.2.2.1. Experimentos 1 y 2

Para conocer la capacidad de enraizamiento se hicieron evaluaciones con ramas separadas de la planta madre (estacas) del Copalche, en dos temporadas del año: a) lluvias y b) secas utilizando Radix[®] (0, 3000 y 6000 ppm). No se obtuvieron raíces en ninguno de los tratamientos.

En el experimento 2, se utilizaron diferentes concentraciones de ácido giberélico Aciggib[®] (0, 1%, 2 % y 4%) y Radix[®] (3000 ppm), y se realizó en la temporada de secas. El cambio de enraizador no promovió el crecimiento de raíces (Figura 9).

Considerando ambos experimentos, en ninguna de las dos temporadas evaluadas hubo crecimiento de raíces. Sin embargo en todos los tratamientos de la temporada de secas en Radix[®] y Aciggib[®] se presentó la formación de brotes en 18 estacas (Figura 9).

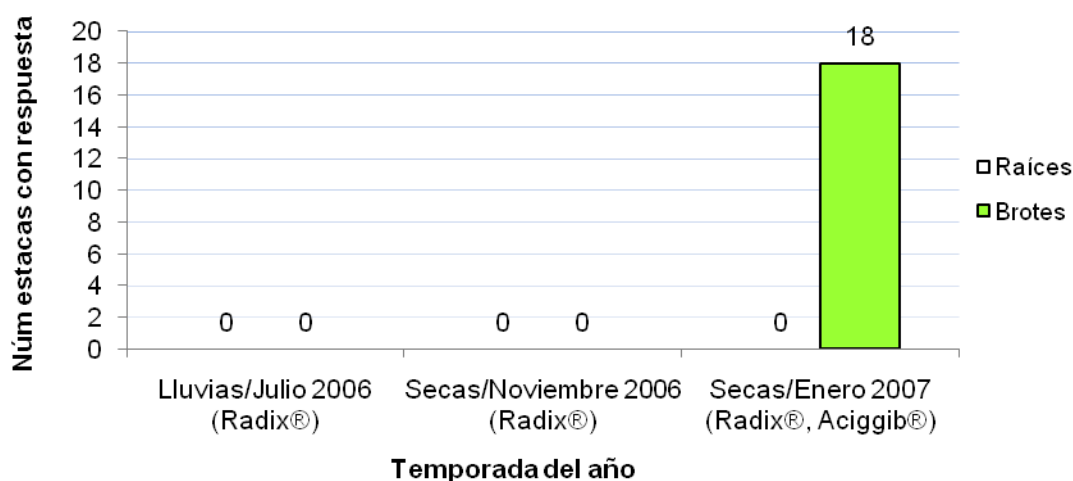


Figura 9. Número de estacas que presentaron brotes en las temporadas de lluvias y secas. Colectadas en J. David Tellitud (Santa Rita), Huetamo de Núñez, Michoacán. N_{total} : 103 estacas, $N_{Julio\ 2006}$: 12 estacas, $N_{Noviembre\ 2006}$: 36 estacas, $N_{Enero\ 2007}$: 55 estacas

Las estacas que presentaron brotes provenían de los siguientes tratamientos:

Tratamiento	Repeticiones	Estacas con brotes:
Testigo	11	4
Radix [®] 3000 ppm	11	7
Aciggib [®] 1%	11	4
Aciggib [®] 2%	11	2
Aciggib [®] 4%	11	1
Total:		18

El ANOVA mostró que existen diferencias significativas en la formación de brotes entre los tratamientos de enraizador ($F= 28.92857$, $P= 0.000002$) (Anexo, Cuadro 1). Y el Análisis de Rango múltiple, mostró que el tratamiento con Radix[®] 3000 ppm fue superior al de Aciggib[®] 4%; con el resto de tratamientos no hubo diferencias significativas (Anexo, Cuadro 2) (Figura 10).

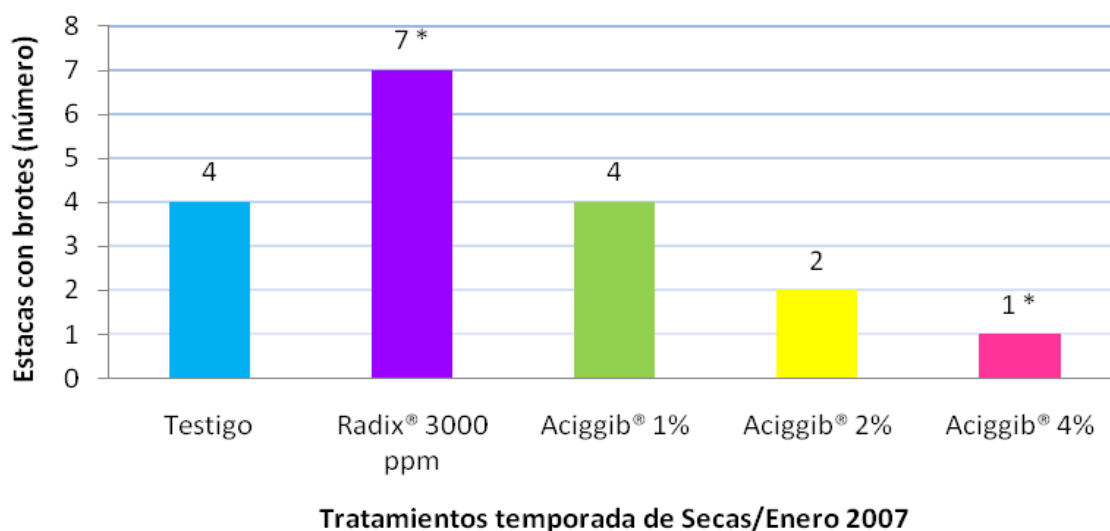


Figura 10. Número de estacas que desarrollaron brotes en enero de 2007, al haberlas expuesto a diferentes concentraciones de Radix[®] y Aciggib[®]. El asterisco (*) muestra que el tratamiento de Radix[®] 3000 ppm fue superior al de Aciggib[®] 4%.

Al no obtener formación de raíces en ninguno de los dos experimentos, no se realizó análisis estadístico para este parámetro.

7.2.3. Cultivo *in vitro*

7.2.3.1. Prueba de germinación

Sólo germinaron las semillas cultivadas en el tratamiento de medio de cultivo sin carbón activado, alcanzando 75% de semillas germinadas (56 semillas) de un total de 75 semillas (Figura 11).

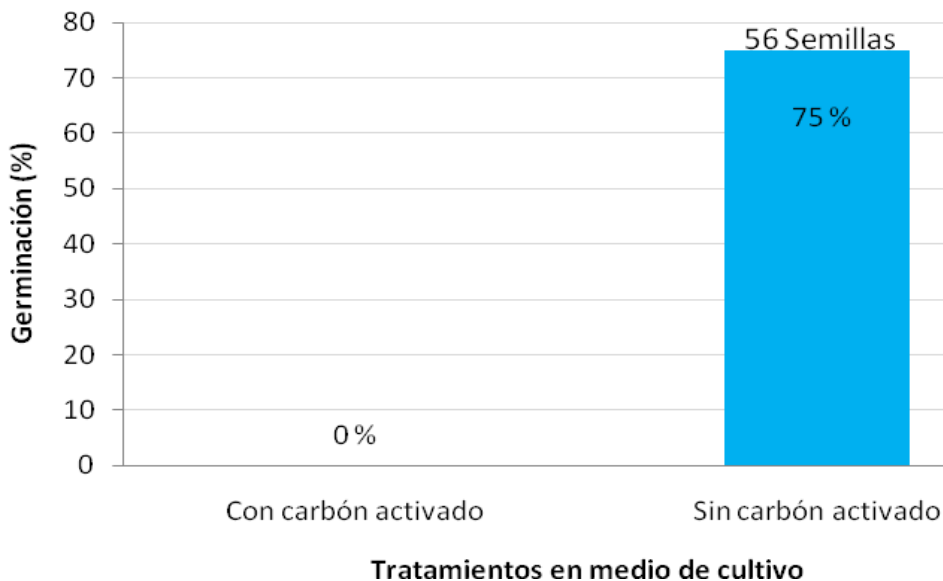


Figura 11. Porcentaje de germinación de semillas de Copalche en medio de cultivo con y sin carbón activado. $N_{\text{Carbón activado}}$: 100 semillas, $N_{\text{Sin carbón activado}}$: 75 semillas.

A partir de las plántulas obtenidas por germinación, se derivaron los siguientes experimentos para la obtención de brotes.

7.2.3.2. Experimento 1: Efecto de la benciladenina (BA) en la propagación *in vitro* de Copalche

La siembra de los entrenudos usados como explantes y en diferentes concentraciones de BA (0, 0.1, 0.2 y 0.4 mM), promovió la formación de un número bajo de brotes por explante. El promedio de brotes por tratamiento fue entre 0.81 y 1.26 brotes por tubo de ensayo, sin distinción notoria entre los tratamientos evaluados (Figura 12).

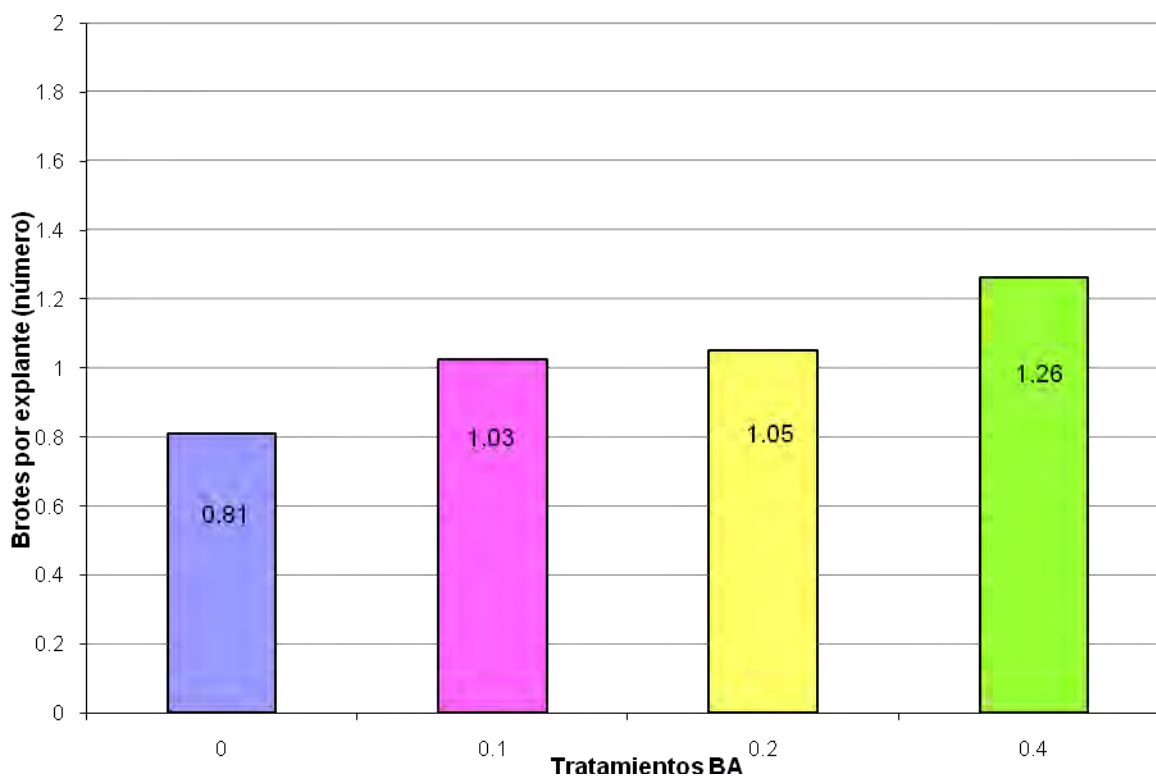


Figura 12. Número de brotes de Copalche, cultivados en tubos de ensayo expuestos a diferentes concentraciones de BA: 0, 0.1, 0.2 y 0.4 mM.

La formación de brotes de explantes de Copalche con cuatro concentraciones de BA mostró que mediante el ANOVA no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($F= 1.45$, $P= 0.2311$) (Anexo, Cuadro 3), siendo el resultado uniforme entre las concentraciones.

7.2.3.3. Experimento 2: Efecto de dos tipos de recipientes: angostos (tubos de ensayo) y anchos (frascos) sobre la propagación *in vitro* de Copalche en medio sin reguladores de crecimiento

Debido al bajo porcentaje de brotes en el experimento 1, se decidió evaluar el efecto del recipiente en la formación de brotes. Para ello se probaron tubos de ensayo y frascos con medio semisólido (Villegas *et al.*, 1992) sin reguladores de crecimiento, debido a que en el experimento 1, los brotes se hiperhidrataron.

En este experimento sólo se obtuvo la formación de brotes en el recipiente más amplio (frascos), de los 32 frascos con 4 explantes cada uno, 29 frascos presentaron explantes con formación de brotes; sin embargo, en los tubos de ensayo no se formaron nuevos brotes, solamente hubo elongación del explante (Figura 13).

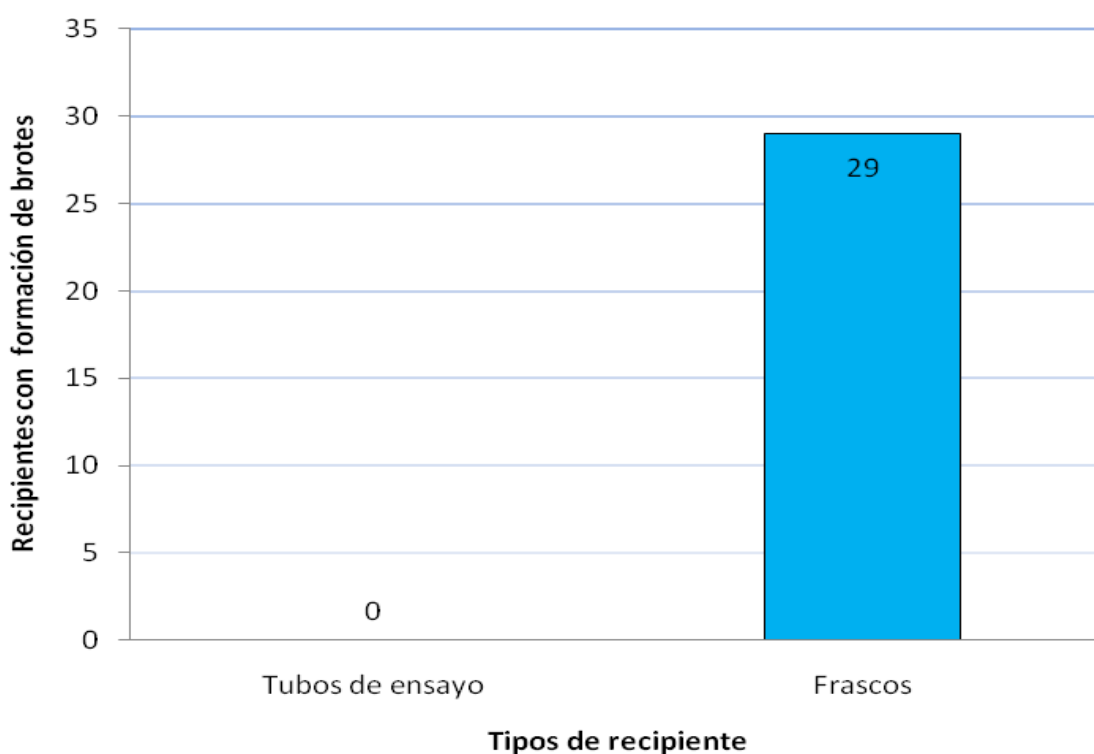


Figura 13. Formación de brotes en dos tipos de recipientes: angosto (tubo de ensayo) y ancho (frasco) a las cuatro semanas del experimento. Los 29 frascos con 4 explantes cada uno presentó formación de brotes, en los tubos no hubo formación de brotes.

Cultivo en recipiente angosto (tubos de ensayo). A las 4 semanas, los explantes de tubo no presentaron nuevos brotes, sólo elongación de los existentes. Y se observó que el 34.6% de los brotes permaneció del mismo tamaño, otro 34.6% incrementó su talla de manera mediana (2 mm aproximadamente) y el 30.8% duplicó la altura (4mm aproximadamente) de los brotes originales (grandes) (Figura 14). Estos resultados mostraron que la condición de recipiente estrecho o tubo, no promovió la formación de nuevos brotes, sólo un aumento en la elongación de los mismos.

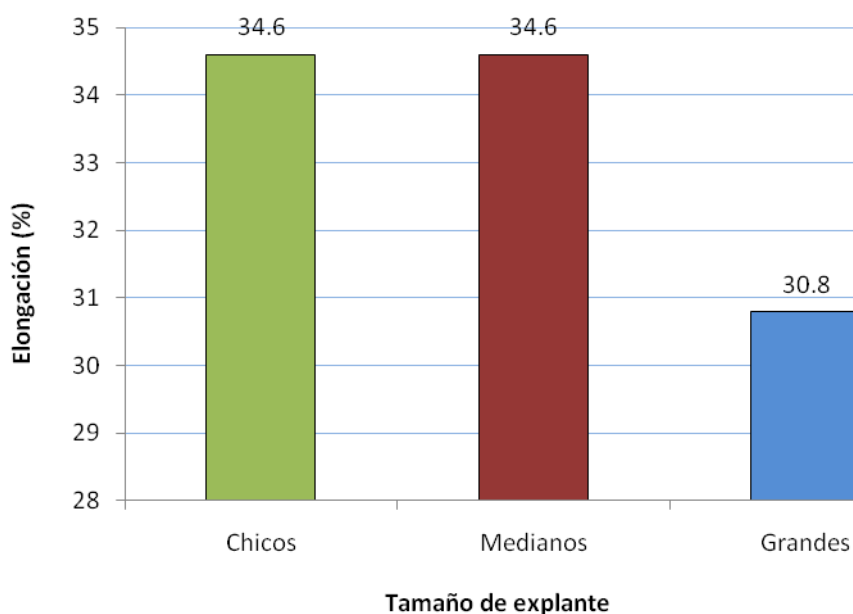


Figura 14. Porcentajes de elongación de explantes en tubo con medio semisólido (Villegas *et al.*, 1992) sin reguladores de crecimiento.

Cultivo en recipiente ancho (frascos). Todos los explantes en frasco presentaron brotes a las 4 semanas del subcultivo en medio semisólido (Villegas *et al.*, 1992) sin reguladores de crecimiento.

El ANOVA en donde se compara el efecto de promoción de la formación de brotes en frasco con medio sin reguladores de crecimiento, a partir de explantes que provenían de tubo con las concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.4 mM de BA, no mostró diferencias significativas ($F= 0.30$, $P= 0.7433$) (Anexo, Cuadro 4). Por lo anterior, se apreció que el

cambio de recipiente estrecho (tubo) a uno más amplio (frasco), fue el factor que propició la formación de brotes.

En los explantes provenientes del experimento 1 con concentraciones de BA a 0.1 y 0.2 mM, se obtuvo 10% de frascos con hojas deformes, comparado con 40% en los explantes que procedían del tratamiento con mayor concentración de BA a 0.4 mM (Figura 15). Así, se observó la tendencia a presentar más brotes con hojas deformes en el tratamiento con la mayor concentración de BA (0.4 mM), que en aquellos con menor concentración (0.1 y 0.2 mM).

Dado que los mejores resultados de propagación se obtuvieron en frascos con medio sin reguladores de crecimiento, se procedió a subcultivar todos los tratamientos en esta condición para obtener mayor número de plantas para experimentos posteriores.

De 55 frascos con 4 explantes cada uno (220 explantes) que fueron subcultivados, se obtuvieron 139 explantes (63.2%) que produjeron nuevos brotes con apariencia sana, siendo éstos la materia prima para el experimento de enraizamiento. En cambio 71 explantes (32.3%) formaron brotes con hojas deformes, los cuales no se utilizaron (Figura 16).

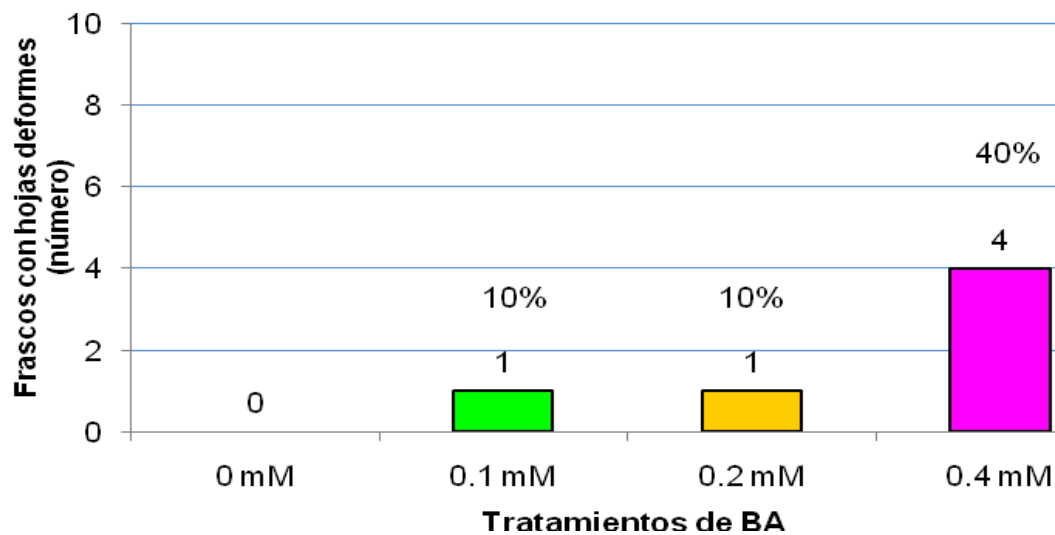


Figura 15. Número de frascos con explantes de Copalche que formaron hojas deformes, obtenidos de explantes provenientes de tratamientos con diferentes concentraciones de BA (0, 0.1, 0.2 y 0.4 mM).

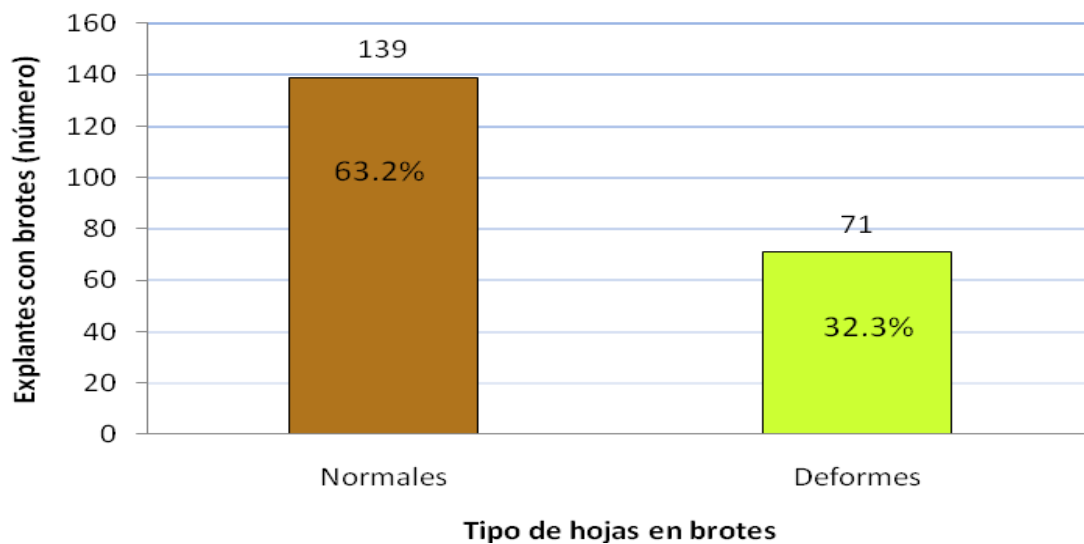


Figura 16. Número de explantes de Copalche con hojas normales o sanas y con hojas deformes provenientes de subcultivo en medio sin hormonas.

7.2.3.4. Experimento 3: Efecto de los reguladores de crecimiento AIB, AIA y BA, en el enraizamiento *in vitro* de Copalche

A partir de los explantes propagados en medio sin reguladores de crecimiento, se evaluó la respuesta al enraizamiento con AIA y AIB y BA, a tres concentraciones con testigo: 0, 0.1, 0.2 y 0.4 mM.

A la quinta semana de cultivo se obtuvo bajo porcentaje de enraizamiento, 1.82% (correspondiente a 3 explantes enraizados), en cambio se logró mayor surgimiento de brotes, 48.78% (en 80 explantes) y de callos 98.18% (en 161 explantes) (Figura 17).

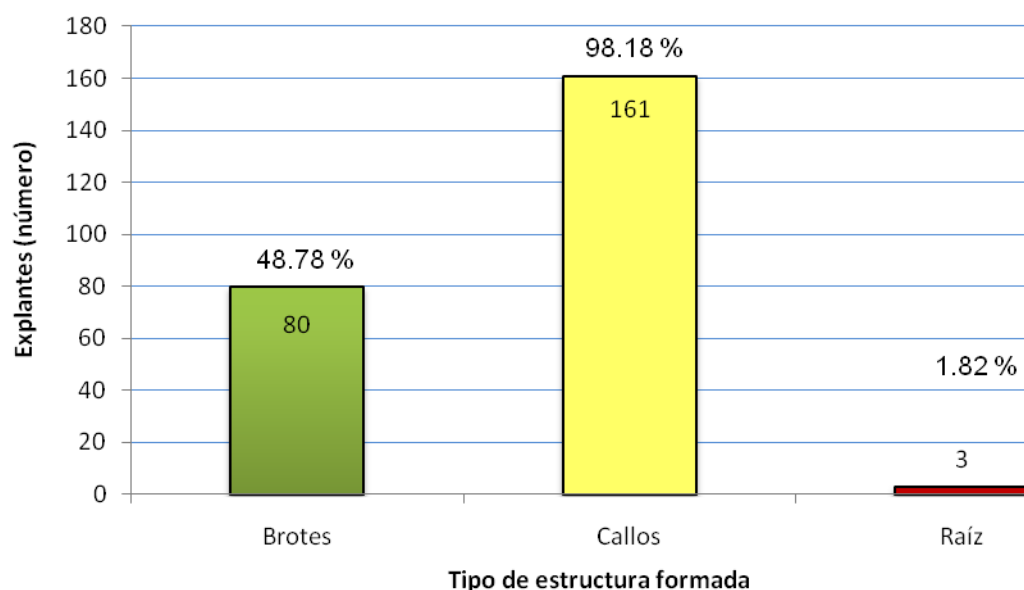


Figura 17. Formación total de estructuras vegetales de Copalche *in vitro* con los tratamientos de AIB, AIA y BA a la quinta semana.

Brotos:

Las concentraciones de BA a 0.1 y 0.4 mM promovieron mayor número de brotes en la semana 3, siendo superiores al testigo y a la concentración de 0.2 mM y al resto de tratamientos con diferentes concentraciones de AIA y AIB, en las semanas 2 y 3 (Figura 18).

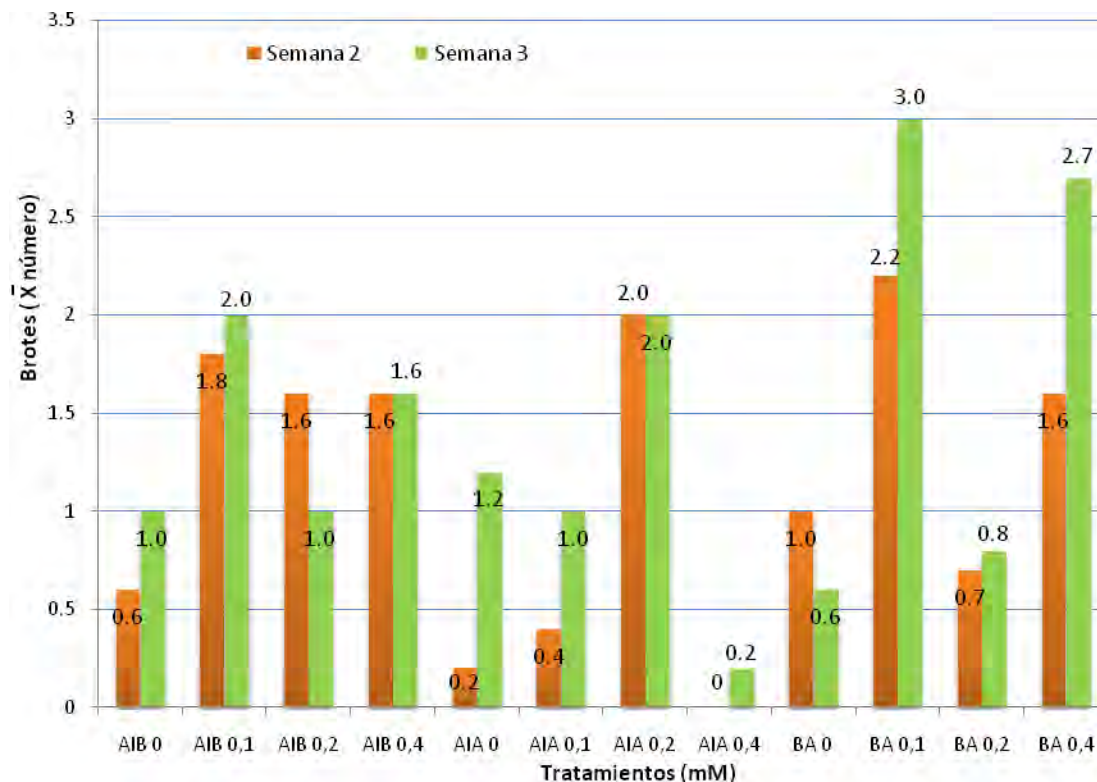


Figura 18. Promedios del número de brotes de Copalche en las semanas 2 y 3, obtenidos en medio de cultivo con los reguladores de crecimiento AIB, AIA y BA a las concentraciones de 0, 0.1, 0.2 y 0.4 mM.

El ANOVA permitió distinguir que no hay diferencias significativas en la obtención de brotes entre las semanas 2 y 3 de evaluación ($F= 1.843$, $P= 0.1765$). En cambio mostró que sí hay diferencias significativas respecto al regulador de crecimiento ($F= 3.107$, $P= 0.0476$) y a la concentración ($F= 4.628$, $P= 0.0040$) (Anexo, Cuadro 5).

De acuerdo al análisis de Rango Múltiple, la respuesta de formación de brotes fue más numerosa con el regulador de crecimiento BA que con AIA; el regulador de crecimiento AIB no mostró diferencias respecto a los otros dos (Anexo, Cuadro 6).

Con esta misma prueba, el número de brotes fue mayor con la concentración de 0.1 mM, que el testigo, en todos los tratamientos. Las concentraciones de 0.2 y 0.4 mM no mostraron diferencias entre el testigo y la concentración de 0.1 mM (Anexo, Cuadro 6).

Callos:

Se obtuvo una prominente formación de callos en todos los tratamientos; sin embargo, el ANOVA mostró que no hay diferencias significativas en la obtención de callos entre las semanas 2 y 3 ($F= 0.529$, $P= 0.4758$); tampoco con los diferentes reguladores de crecimiento ($F= 2.617$, $P= 0.0763$) y finalmente con las concentraciones tampoco hay diferencias significativas ($F= 1.000$, $P= 0.3948$) (Anexo, Cuadro 7).

Raíz

En general se obtuvo baja promoción del enraizamiento (1.82%) y en un tiempo más prolongado (semana 4 y 5) (Figura 19) que la respuesta de brotes y callos (semanas 2 y 3). La concentración donde se presentaron raíces fue en AIB 0.2 mM y en un testigo, por lo cual no se realizó el ANOVA de estos datos.

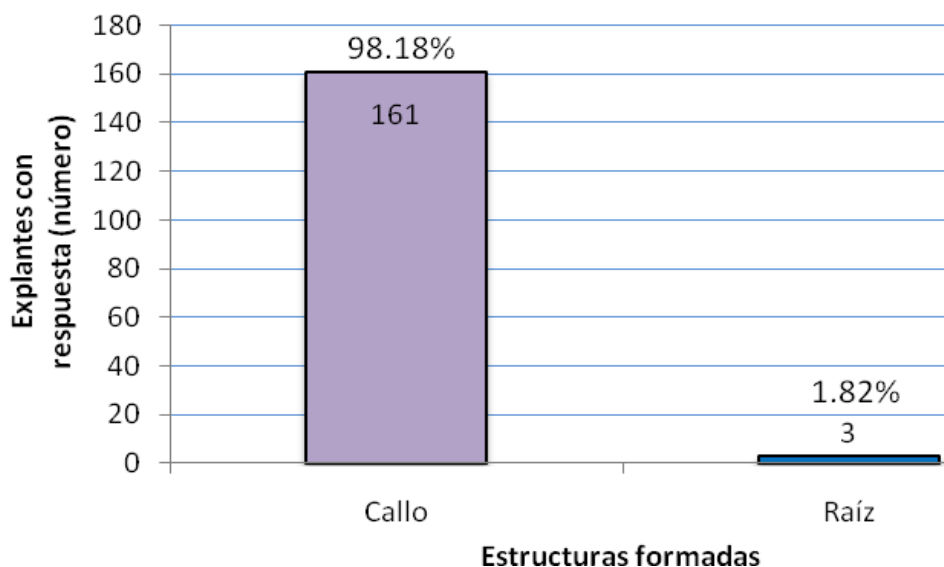


Figura 19. Número de explantes de Copalche con formación de callo y raíz obtenidos la semana 5, utilizando los reguladores de crecimiento AIB, AIA y BA a las concentraciones de 0, 0.1, 0.2 y 0.4 mM.

7.2.3.5. Experimento 4: Efecto de los reguladores de crecimiento AIB y AIA en el enraizamiento *in vitro* de Copalche

En este experimento se trabajó con los reguladores de crecimiento AIB y AIA, eliminando el testigo y aumentando las concentraciones a 0.2, 0.4 y 0.8 mM, para evaluar su efecto en la inducción de enraizamiento. La respuesta de formación de raíces nuevamente fue mínima (1.42%) encontrando sólo formación de raíces en dos explantes correspondientes a la concentración de 0.4 mM de AIB y de AIA (Figura 20).

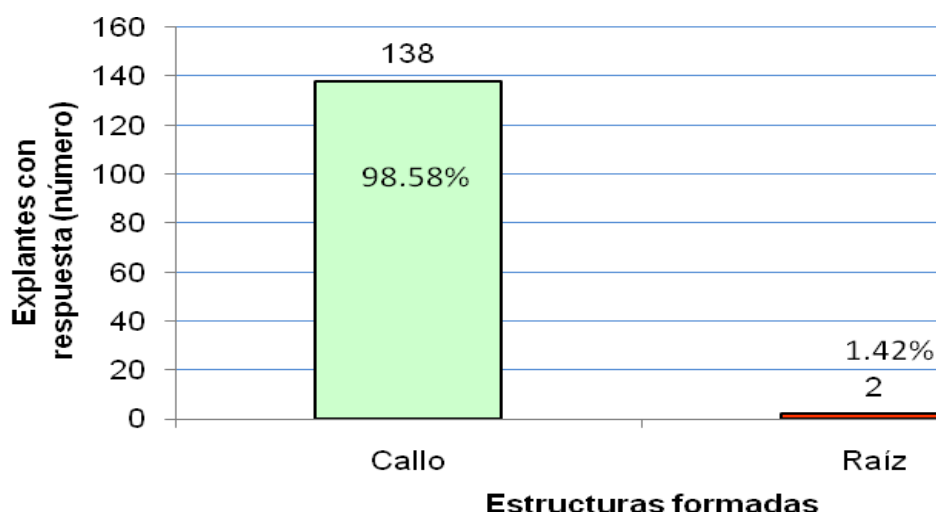


Figura 20. Número de raíces formadas a la segunda semana.

Los tratamientos que se ensayaron indujeron principalmente callo y en mínima proporción brotes.

Respecto a la inducción de callo, en la segunda semana se encontró mayor formación en los tratamientos de AIB con las mayores concentraciones: 0.4 y 0.8 mM y de AIA en las concentraciones de 0.2 y 0.4 mM. Sin embargo, no se tienen diferencias significativas entre hormonas ($F= 1.061$, $P= 0.3124$) ni entre concentraciones ($F= 1.061$, $P= 0.3605$) (Anexo, Cuadro 8).

7.3. Propagación Sexual

7.3.1. Emergencia de plántulas

Se evaluó la emergencia de plántulas de dos colectas realizadas en la temporada de secas.

En la temporada de secas/enero 2007 se registró un reducido número de plántulas que emergieron a partir de la cuarta semana, el cual se mantuvo sin incremento. Por su parte, las semillas que se sembraron en la temporada de secas/marzo 2007, iniciaron su emergencia en la tercera semana e incrementaron su porcentaje en la quinta y séptima semana (Figura 21).

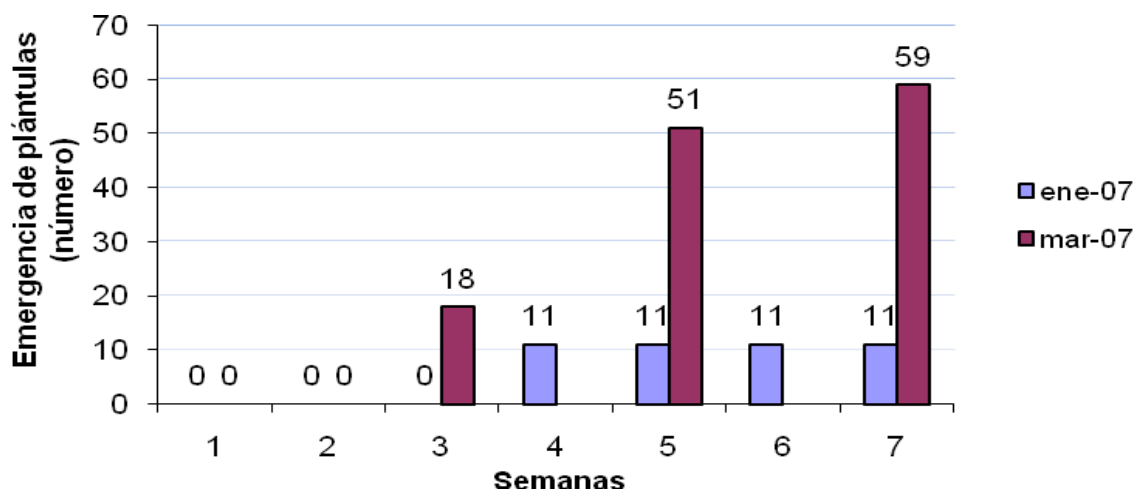


Figura 21. Dinámica de emergencia de plántulas de Copalche sembradas el 12 enero 2007 y 10 marzo 2007. Colectadas en J. David Tellitud (Santa Rita), Huetamo de Núñez, Michoacán. N_{total} : 200, Edad: recién colectadas en temporada de secas: diciembre 2006 y febrero 2007.

En la siembra de secas/enero 2007 se obtuvo bajo porcentaje de emergencia de plántulas (5.5%), el mayor registro se logró después de un mes (11 plántulas) sin mayor incremento en las subsecuentes evaluaciones.

En la siembra de secas/marzo 2007 se obtuvo el 29.5% de emergencia de plántulas a la séptima semana (59 plántulas) (Figura 22).

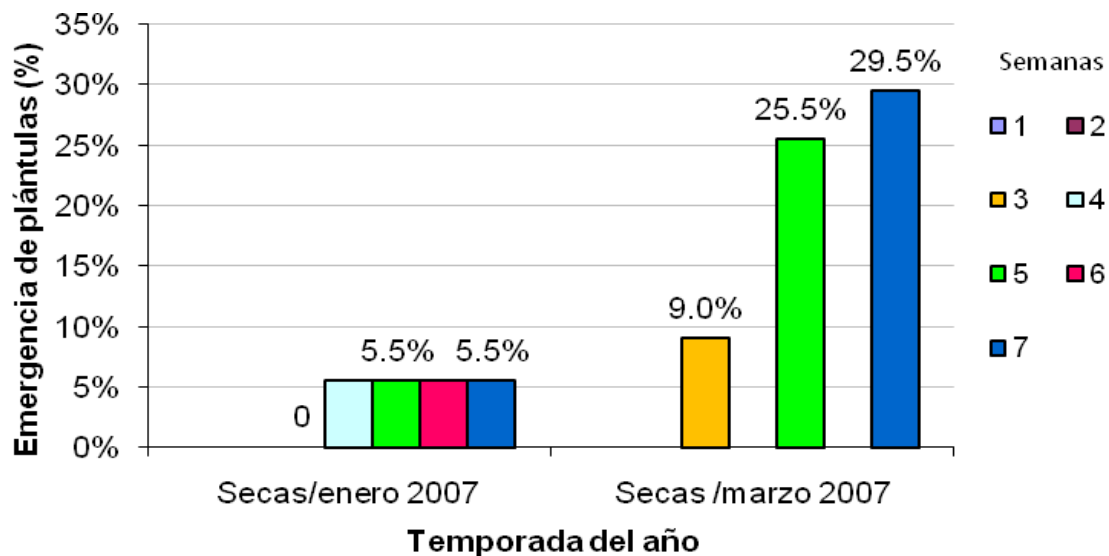


Figura 22. Porcentaje de germinación de plántulas de Copalche sembradas en la temporada de secas de 2007, 12 enero y 10 marzo. Colectadas en J. David Tellitud (Santa Rita), Huetamo de Núñez, Michoacán. N_{total} : 200, Edad: recién colectadas en temporada de secas: diciembre 2006 y febrero 2007.

El ANOVA mostró que no hubo diferencias significativas entre dos meses del año, en que se hizo el ensayo ($F= 3.17078$, $P= 0.100275$) (Anexo, Cuadro 9). Sin embargo se observó una tendencia a obtener mayor número emergencia de semillas en las sembradas en marzo de 2007.

8. DISCUSIÓN

Hintonia latiflora (Copalche) es un árbol cuya corteza se ha utilizado en medicina tradicional para distintas afecciones: aparato digestivo, heridas, úlceras, dengue, contra el paludismo e incluso para controlar los niveles altos de azúcar en sangre (diabetes) siendo este último el más difundido actualmente (Anaya Dávila-Gabiri, 1991; Aguilar *et al.*, 1994; Hersch, 1999; Márquez *et al.*, 1999; Bnouham *et al.*, 2006; Cristians Niizawa, 2009).

En México, una de cada tres personas muere por causa de diabetes, ocupando en los últimos años el primer lugar como causa de muerte en el país (OMS y OPS-OMS, 2006) y considerando los altos costos de un tratamiento crónico degenerativo como es el que se requiere para la diabetes y otros padecimientos, la demanda de especies medicinales para el control de estas enfermedades es amplia y entre las cuales se encuentra el tratamiento con la infusión de la corteza de Copalche.

La demanda de Copalche en los mercados de México se transfiere a los recolectores de las diferentes zonas donde se distribuye la especie, quienes realizan el descortezamiento de los árboles, a tal grado que no logran regenerar sus tejidos y sucumben ante infecciones y falta de aporte de nutrientes al ser dañados o eliminados el tejido floemático que los conducen. Tales prácticas provocan la muerte de los árboles, siendo cada vez más difícil la obtención del recurso por la falta de plantas.

Una forma de contribuir a la preservación de las poblaciones silvestres de Copalche, es promover el cultivo de la especie en solares o traspatios de las zonas donde está distribuido, para facilitar el aprovechamiento del recurso, evitando la pérdida de ejemplares de las poblaciones naturales.

8.1. Distribución geográfica

Los estudios del Dr. Borhidi (2006) especialista en Rubiáceas, señalan que la especie se distribuye en todo el territorio nacional; sin embargo, los resultados de la revisión de 238 ejemplares de *H. latiflora* (Copalche), de los herbarios de la Facultad de Ciencias (FCME) y Herbario Nacional (MEXU), mostraron que la especie se ha colectado en 17 estados que comprenden principalmente la vertiente del Océano Pacífico, desde Sonora hasta Chiapas, incluso se reportan en Guatemala y El Salvador y las zonas media y sur de la República Mexicana, no hay registros de distribución en la vertiente del Golfo de México.

8.2. Sitio de estudio

J. David Tellitud (Santa Rita), Huetamo, Michoacán, se encuentra dentro del área de distribución descrita en la literatura y en los ejemplares de herbario consultados para la especie.

La zona de J. David Tellitud (Santa Rita), Huetamo, Michoacán, presenta un clima cálido-seco, con lluvias en verano: BS1 (h')w(w)(i')g, con temperaturas promedio máxima de 28° C y mínima de 20° C; la temporada de secas es prolongada, casi de 8 meses, de octubre a mayo, con sólo 4 meses de lluvia (García, 1988).

Estas condiciones exponen a las plantas a presiones ambientales rigurosas durante la temporada de secas, en la que los árboles de Copalche pierden sus hojas, completan la maduración de sus frutos y concentran en sus tallos (principalmente en la corteza) las reservas de nutrientes y metabolitos secundarios que generaron en la época de lluvias.

De acuerdo a la información bibliográfica y de herbario, la floración se presenta desde marzo a abril y se llega a prolongar hasta junio o julio; las observaciones en el sitio de estudio, revelaron que en el año de 2006 y 2007, sólo se presentó la floración de junio a julio cuando empieza la temporada de lluvias. Las condiciones de humedad y altas temperaturas en la zona propician el crecimiento de hongos y el ataque de insectos en el follaje de todos los árboles observados. El periodo de fructificación, en J. David Tellitud (Santa Rita), Huetamo, Michoacán empezó desde agosto y septiembre, encontrándose

frutos maduros a partir de diciembre hasta principios de marzo. Estos últimos fueron los que presentaron mejor respuesta a la germinación.

8.3. Descripción del fruto y semilla

Los frutos y semillas utilizados en este trabajo concuerdan con las descripciones que han realizado Niembro, 1989; Borhidi, 2006 y Cristians Niizawa, 2009, entre otros y con las descripciones de los ejemplares de herbario revisados. La aportación de este trabajo es el número de semillas por fruto, el cual puede variar desde 36 a 100 aproximadamente, este varía dependiendo del tamaño del fruto.

La confirmación de que se trataba de *H. latiflora* se logró a través de la identificación de los ejemplares colectados hecha por la M. en C. Rosa María Fonseca Juárez, Técnico Académico del Laboratorio de Taxonomía de Plantas Vasculares en la Facultad de Ciencias, UNAM.

8.4. Propagación

El Copalche que se desarrolla en J. David Tellitud (Santa Rita), Huetamo, Michoacán, se encuentra dentro de la vegetación de Bosque Bajo Caducifolio formando pequeños grupos de árboles, los cuales en su mayoría son adultos. En esta población, los comentarios de los pobladores señalan que hace aproximadamente 20 años se podía encontrar a los árboles de Copalche al salir de las parcelas de cultivo; sin embargo ahora sólo se encuentran algunos manchones de cuatro a seis árboles adultos y pocos árboles jóvenes, en un área muy y lejana del poblado (2km).

Los pobladores y las Autoridades del Ejido: J. David Tellitud (Santa Rita), Huetamo, Michoacán, aprecian el beneficio medicinal que les ofrece la corteza del Copalche y aceptan con agrado los esfuerzos por obtener más plantas de la especie.

La revisión bibliográfica mostró que existe gran cantidad de referencias relacionadas con el análisis de los compuestos químicos de la especie *H. latiflora* (Reguero *et al.*, 1987; Mata *et al.*, 1990; Mata *et al.*, 1992; Márquez *et al.*, 1999; Argotte-Ramos, 2006), por su alto contenido de taninos y actividad farmacológica (Bnouham *et al.*, 2006; Déciga-Campos *et al.*, 2007). Pero son escasas las referencias en relación a la propagación vegetativa de

Rubiáceas, sin embargo existen bastantes trabajos que dan información sobre germinación de Rubiáceas (Baskin y Baskin, 1998). El Café, es una de las Rubiáceas más propagadas por su alto valor comercial; sin embargo los procedimientos de propagación del café no se pueden tomar como referencia porque es una especie de clima templado de Bosque Mesófilo de Montaña y porque algunos de los tratamientos utilizados son para cultivo *in vitro* (González *et al.*, 2000; Barretto *et al.*, 2002; Hermoso y Menéndez., 2000; Rodríguez, 2002 y Feria, *et al.*, 2003).

Para la propagación del Copalche se tomaron en cuenta las características de clima del sitio de estudio y también su tipo de vegetación (Bosque Bajo Caducifolio; Rzedowski, 1994), por lo que los procedimientos son totalmente diferentes.

Las opciones de propagación que se ensayaron en este trabajo comprendieron pruebas de reproducción vegetativa por acodos, estacas y cultivo de tejidos, y una prueba de reproducción sexual con semillas y su el registro de la emergencia de plántulas de Copalche.

8.4.1. Propagación vegetativa

8.4.1.1. Acodos y Estacas

Considerando el ambiente en que se desarrolla la especie, se realizaron acodos y estacas en dos temporadas del año (secas y lluvias), con el supuesto de que: a) en los ensayos realizados en temporada de secas, abril 2006 y enero 2007, las ramas de los árboles contendrían altas concentraciones de nutrientes y metabolitos, como preparativo por la propia fisiología del árbol para la temporada de lluvias, lo que promovería la formación de raíces; b) en temporada de lluvias, julio de 2006, cuando el árbol presenta follaje y el aporte de fotosintatos nuevamente aumentaría la concentración de nutrientes y metabolitos, que promoverían la formación de raíces.

Los resultados mostraron que tanto en acodos como en estacas se presentó la formación de brotes y yemas en el tallo, en las temporadas correspondientes a la época de sequía: abril 2006 y enero 2007, lo cual refleja la respuesta por las sustancias de reserva acumuladas en

el floema por las plantas; estos materiales de reserva generalmente son empleados en la formación de hojas, flores y frutos en una planta adulta (Taiz y Zeiger, 2000).

En los acodos y estacas al hacer una obstrucción o corte en el floema, se crea la acumulación de estos compuestos (nutrientes o fotosintatos), en la zona superior del anillo de los acodos y a la parte basal de las estacas, promoviendo la producción de raíces (Longman y Wilson, 1993; Hartmann *et al.*, 1997).

Sin embargo, en ninguno de los experimentos se logró obtener enraizamiento, sólo formación de yemas o brotes. Uno de los factores que puede influir en el enraizado de una estaca es la cantidad de auxinas utilizadas: cada especie reacciona diferente a los estímulos que se le aplican, por lo tanto se deben variar las concentraciones y observar si al elevar éstas se obtiene enraizamiento. Por ejemplo, a altas concentraciones se puede promover la síntesis de algunos compuestos, como los fenoles, que pueden ser causantes de pudrición. Otro factor es el estado de madurez de las mismas estacas, ya que la cantidad de nutrientes de reserva que tienen es diferente en cada etapa de crecimiento: juvenil o madura (Alcántara, 2006; Santelices y Cabello, 2006).

Latsague y Lara, (2003), menciona que en general las plantas leñosas presentan dificultades para enraizar; este tipo de comportamiento se puede atribuir a que los tejidos involucrados presentan células con mayor tendencia a la diferenciación, lo cual obstaculiza la desdiferenciación de los tejidos involucrados en el proceso de enraizamiento; también sugiere que otro factor que influye es la diferente producción de fenoles en cada especie. En el género *Nothofagus*, se ha probado su capacidad de enraizamiento; en *N. alpina* se ha obtenido una buena producción de raíces con diversos tratamientos de auxinas como AIA y AIB, sin embargo la especie *N. pumilio* no forma raíces en ninguno de los tratamientos con AIB sometida a diferentes concentraciones, en diferentes temporadas del año, ya que los fenoles producidos por la propia planta pueden causar una oxidación de las auxinas aplicadas como tratamiento y se tiene como resultado la muerte celular en el lugar del corte de la estaca.

En el experimento de *H. latiflora* realizado en la temporada de secas se presentó la formación de brotes en las estacas, lo que podría significar que la planta está mandando los

nutrientes que tiene acumulados hacia las partes aéreas y no a la producción de raíces, por lo que se puede pensar que cuando se forma un brote o una yema se está indicando que no hay raíces.

La mayor parte de los productos de la fotosíntesis se transportan desde las hojas hasta los sitios en donde son ocupados a lo largo de la planta, ya sea para crecimiento, metabolismo o formación de órganos. Uno de estos productos son los carbohidratos, que junto con otras sustancias como las auxinas contribuyen a la generación de raíces (Ferguson *et al.*, 1985 y Melvin, 1998). Considerando lo anterior, se sugiere hacer ensayos de estacas con hojas para reconocer si el aporte de fotosintatos junto con las auxinas, favorece el enraizamiento (Parra, 1976; Salcedo, 1985; Naranjo, 1986; Espinoza, 1987; Jaen, 1998).

En los experimentos de estacas se observó que la temporada de secas (enero 2007) produjo brotes, pero en lluvias (julio 2006) y al inicio de secas (noviembre 2006) no, lo cual se podría asociar con la acumulación de nutrientes, incluyendo a los carbohidratos, como preparación de la propia planta para la temporada favorable (lluvias), en la cual necesitará de sus reservas para la formación de hojas, floración y producción del fruto. La diferencia de temperaturas entre el sustrato y la parte aérea puede inducir a la brotación de hojas e inhibir la producción de raíces (Alcántara, 2006), esto debido a que hay amortiguamiento de temperaturas en el sustrato y ocasiona que se mantenga un ambiente fresco en el tallo, donde está latente el tejido que da origen a las hojas, por lo que los nutrientes son enviados a estas zonas para su formación.

En los acodos, la aplicación de auxinas externamente tiene muchas ventajas, ya que al no cortar el suministro de nutrientes de la planta madre puede promover a la formación de raíces. Sin embargo en *H. latiflora* no se presentó la formación de raíces, solamente yemas. Lo que indica que las concentraciones de enraizador comercial utilizadas no son las adecuadas y también indica que este tipo de planta está produciendo una respuesta diferente a la esperada, al mismo tiempo se puede considerar que hay otros factores involucrados en el enraizamiento.

Hartmann *et al.* (1997), proponen que los reguladores u hormonas sintéticas, se unen a los reguladores de crecimiento intrínsecos de la planta, haciendo una complementación y

teniendo como resultado mayor número de yemas, hojas, brotes, etc., y con esto se tiene mayor probabilidad de obtener sustancias como las auxinas para estimular la formación de raíces. En el presente trabajo la respuesta no derivó en raíces, sino en la formación de brotes en estacas o en la formación de yemas en acodos, ambos en la temporada de secas.

Por lo cual se recomienda probar diferentes aplicaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento, para obtener la formación de raíces.

8.4.1.2. Cultivo in vitro

8.4.1.2.1. Prueba de germinación

El objetivo de este experimento fue la obtención de plantas sanas para su uso en experimentos posteriores. El árbol de Copalche presentó frutos maduros en la temporada de secas (enero-marzo), con porcentajes de germinación cercanos al 30% en suelo y al 75% en cultivo de tejidos. Es posible que las condiciones de medio de cultivo con nutrientes, humedad y temperatura constantes, hayan propiciado mejor respuesta de germinación en condiciones *in vitro* que en suelo, donde las semillas estuvieron expuestas a mayor variación de la temperatura y luz.

El carbón activado se utilizó como agente antioxidante, ya que tiene como función la reducción o inactivación de reacciones de oxido-reducción (Redox), lo que permite que los explantes que se colocan en el medio de cultivo, no sufran oxidaciones que lleguen a afectarlo completamente (Pedroza-Manrique, 2009).

El Copalche presenta metabolitos secundarios que a la vez de proteger a la planta de depredadores, también pueden contribuir a una oxidación de las semillas si se colocan en un ambiente húmedo, por lo que al agregar el carbón activado al medio de cultivo se pretendía minimizar esa oxidación. Se ha visto que el uso de carbón activado propicia el crecimiento de explantes en cultivo *in vitro* de varias cactáceas como *Browningia candelaris* (Sánchez y Pérez, 2007), *Epidendrum elongatum* (Pedroza-Manrique, 2009), orquídeas, agaves, entre otras.

A su vez, en orquídeas se ha observado que el uso del carbón activado en los medios de cultivo, favorece el desarrollo del sistema radical, porque el oscurecimiento del medio de

cultivo favorece la formación de mayor número de raíces positivamente geotrópicas (Pedroza-Manrique, 2009). Sin embargo, el uso de carbón activado como componente del medio de cultivo, en algunos casos tiene efecto inhibitorio, debido a que puede absorber diferentes sustancias tales como hormonas vegetales y otros reguladores de crecimiento, además de diversos compuestos orgánicos e inorgánicos, contenidos tanto en el medio de cultivo como liberados por las mismas plantas (Pierik, 1990). Roca y Mroginski (1993), mencionan que la oxidación de algunos compuestos químicos como taninos, fenoles y polifenoles es causa de la inhibición de las actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de proteínas y la respuesta de la planta a las diferentes hormonas y reguladores del crecimiento.

La oxidación de los tejidos vegetales cultivados en condiciones *in vitro* con carbón activado, puede ser un factor que suprima la respuesta de crecimiento y desarrollo del tejido provocando una posterior necrosis del mismo. Sin embargo, la adición de auxinas en combinación con carbón activado puede ser una opción para propiciar la germinación de semillas en cultivo *in vitro* de *H. latiflora*, como lo reporta Pedroza-Manrique (2009), para explantes de orquídea, donde se potencializa el crecimiento de los mismos.

8.4.1.2.2. Experimento 1: Efecto de la benciladenina (BA) en la propagación *in vitro* de Copalche

El objetivo de este experimento fue la obtención de brotes a partir de entrenudos de plantas obtenidas *in vitro*, para lo cual se probó el efecto de la benciladenina (BA) en diferentes concentraciones (0, 0.1, 0.2 y 0.4 mM). En especies como *Nothofagus pumilio* (Martínez Pastur y Arena, 1997), el uso de BA en diferentes concentraciones, logró la obtención de brotes en explantes (brotes de ramas bajas) con efecto significativo en el largo y número de brotes axilares entre los distintos tratamientos.

Sin embargo, en los tratamientos con *H. latiflora* no hubo formación de brotes en ninguna de las concentraciones de BA, sólo alargamiento de los mismos. Este resultado podría deberse al tipo de recipiente usado que fueron tubos de ensayo, los cuales pudieron ejercer efecto inhibitorio por la cercanía de la pared, lo cual podría propiciar más la elongación que la multiplicación de los brotes.

Por lo anterior, se sugirió para esta especie la siembra en otro tipo recipientes, sin el uso de reguladores de crecimiento, para observar si esta condición influía en la formación de brotes.

8.4.1.2.3. Experimento 2: Efecto de dos tipos de recipientes: angostos (tubos de ensayo) y anchos (frascos) sobre la propagación *in vitro* de Copalche en medio sin reguladores de crecimiento

Con el supuesto de que la forma del recipiente incidiría en el crecimiento de brotes en los explantes, se realizó un subcultivo a partir de explantes del experimento anterior y sin reguladores de crecimiento, comparando dos tipos de recipientes: tubos de 2.5 cm de diámetro x 14.6 cm de largo, con frascos de 5.7 cm de diámetro x 6.7 cm de alto, permitiendo estos últimos mayor amplitud en el espacio disponible. El cambio de recipiente promovió resultados favorables para los explantes cultivados en frascos, en donde se hubo una formación de 29 brotes nuevos a partir de 116 explantes (24.4%) y en los tubos solamente se registró crecimiento en longitud de los explantes, más no hubo brotes nuevos. Dado que la forma del recipiente sí influyó en el crecimiento de brotes, sólo se utilizaron frascos para los experimentos posteriores. La ausencia del regulador de crecimiento no influyó en la formación de brotes, por lo que se mantuvo esta condición para todos los explantes.

Sin embargo se presentó un nuevo inconveniente: alta proporción de hojas deformes en aquellos explantes provenientes de cultivos con BA. La causa probable fue la hiperhidratación, consecuencia de las concentraciones de BA usadas en el experimento 1, como lo mencionan Parada y Villegas (2009) para híbridos de almendro x durazno H1. En *H. latiflora*, a mayor concentración de BA, se obtuvo mayor porcentaje de hojas deformes (40% de los explantes provenientes del tratamiento 0.4 mM de BA).

Para evitar esta situación e ir eliminando los residuos de BA que produjeron estas deformaciones, se realizaron subcultivos con medio sin reguladores de crecimiento y como resultado se tuvieron 220 explantes con 67.7% los mismos sin hojas deformes.

8.4.1.2.4. Experimento 3: Efecto de los reguladores de crecimiento AIB, AIA y BA, en el enraizamiento *in vitro* de Copalche

Cuando los explantes ya se han multiplicado, el siguiente paso es que formen raíz, por lo que en este experimento se evaluó la respuesta de enraizamiento con dos Auxinas, AIA y AIB, y una Citocinina, BA, a tres concentraciones con testigo: 0, 0.1, 0.2 y 0.4 mM.

Los explantes de *H. latiflora* formaron principalmente brotes y callos. Los callos surgían de la base del explante (entre nudo), y se observaba que en el mismo explante, pero en áreas más alejadas de la base (cercanas a las hojas existentes), se formaban brotes.

Rojas (1993) y Pérez y Martínez (1994), afirman que en avena, las citocininas eliminan la latencia de las yemas axilares y promueven la formación de brotes laterales.

La proporción en que se utilicen las citocininas y las auxinas es la que determina la diferenciación de las células hacia distintos tejidos: una proporción alta de citocininas promueve el desarrollo de brotes y una proporción alta de auxinas promueve el desarrollo de raíces (Martínez y Pacheco, 2006). Sin embargo, en *H. latiflora* no se logró inducir la formación de raíces.

Los tratamientos de AIB 0.1 mM, AIA 0.2 mM y BA 0.1 mM promovieron la formación de mayor número de brotes con mayor longitud de entrenudos en la tercera semana de cultivo, favoreciendo que el explante se pudiera manejar mejor para los subcultivos.

La formación de callo en los explantes se presentó desde la primera semana, y a la quinta semana ya se tenía un porcentaje alto (98.18%). La presencia de callo se formó por el uso de auxinas en el medio de cultivo, por ejemplo: en algunas especies como aguacate (Pliego *et al.*, 1999), alcachofa (De León, 2003), castaño (Ríos *et al.*, 2005), cempaxúchil (Martínez-Bonfil *et al.*, 2005), entre otras, han producido callo por efecto de alguna auxina; los callos producidos suelen aparecer en cortos periodos de tiempo y se puede prolongar hasta que se induzca raíz o hacia la embriogénesis somática.

Existen diferentes trabajos de propagación que señalan el uso de AIB, AIA y BA como promotor de formación de raíces, por ejemplo: *Furcraea macrophyla* (Martínez y Pacheco, 2006), distintas especies de Agaves mexicanos (Domínguez, *et al.*, 2008), cactáceas como

Thelocactus rinconensis (Díaz, 2007), entre muchas otras (Martínez Pastur y Arena, 1997; Tacoronte et al., 2004; Enríquez *et al.*, 2005).

En *Prunus* (Parada y Villegas 2009), la auxina AIB (2.1 y 3.4 μ M) maximiza la formación de raíces, mientras que en ausencia de AIB no hubo enraizamiento; el aumento en el número de raíces se encuentra ligado al aumento de la concentración de la auxina.

Sin embargo, en *H. latiflora* se presentó la formación de raíces en un porcentaje muy bajo (1.82%) hasta la 5ta semana, en tratamientos con AIB 0.2 mM y en un testigo. Esto se debió a que la concentración de la auxina no fue la indicada para inducir el enraizamiento de un mayor número de explantes, por lo que se planteó aumentar la concentración de AIA y AIB.

Domínguez *et al.* (2008) y Díaz (2007) probaron el uso de medio de cultivo con y sin reguladores de crecimiento, y ambos autores mencionan que el enraizamiento se logró en los medios que no contenían reguladores de crecimiento. Esto concuerda con el explante que produjo raíz de *H. latiflora*, por lo que se le puede atribuir a la especie la capacidad de formación de raíces sin uso de reguladores de crecimiento exógenos, aunque en muy baja proporción.

Por lo tanto se puede considerar fomentar el enraizamiento mediante esta técnica utilizando medio de cultivo sin reguladores de crecimiento y por tiempos prolongados, y observar si esto contribuye a la formación de raíces.

8.4.1.2.5. Experimento 4: Efecto de los reguladores de crecimiento AIB y AIA en el enraizamiento *in vitro* de Copalche

El aumento en la concentración de las auxinas AIB y AIA (0.4 mM), no estimuló el enraizamiento (1.42%) aunque se logró en menor tiempo (a las 2 semanas) comparándolo con la concentración de 0.2 mM de AIB usada en el experimento 3, la cual indujo raíces hasta la cuarta y quinta semana. Aunque se incrementó la concentración de las auxinas en este experimento, no se observó una diferencia significativa en la formación de raíces dentro de los tratamientos, sólo se incrementó la proporción de callos (98.58%), desde la segunda semana.

Esto lleva a afirmar que la especie es de difícil enraizamiento porque en otras especies se han utilizado concentraciones más bajas de auxinas y citocininas, del rango μM y que han dado resultados positivos, a diferencia de las usadas en los experimentos de la presente investigación, donde se aplicaron reguladores en el rango de mM (Domínguez *et al*, 2008); Díaz, 2007; Martínez-Bonfil *et al*, 2005).

Otras especies que son consideradas de difícil enraizamiento son: *Cecropia obtusifolia* (Nicasio *et al*, 2005), *Pinus jaliscana* (Aparicio *et al*, 2006), *Malpighia glabra* y *M. emarginata* (Moratinos *et al*, 2008) entre otras. En ellas se ha producido callo con tratamientos de propagación vegetativa de estacado y cultivo *in vitro*, y se resalta que sus características genóticas son las que contribuyen a que la producción de raíces sea más lenta o no se presente con tratamientos de enraizadores externos.

Por lo que podemos incluir a *H. latiflora* dentro del grupo de plantas de difícil enraizamiento, hasta que se prueben otras concentraciones de enraizadores y otras condiciones para propiciar la formación de raíces en acodos, estacas o cultivo *in vitro*.

8.4.2. Propagación sexual

8.4.2.1. Germinación de semillas

La germinación de las semillas de Copalche presentó bajos porcentajes, de 5%, en aquellas provenientes de frutos colectados en diciembre de 2006 y de 29% en las semillas de frutos colectados en febrero y marzo de 2007.

De 36 reportes sobre germinación de especies de la familia Rubiaceae que se desarrollan en distintos tipos de vegetación, 25 trabajos (69%) reportan que las semillas presentaban latencia fisiológica (LF) (Baskin y Baskin, 1998) (Anexo, Cuadro 10), la cual se caracteriza porque las semillas son permeables al agua, pero presentan un mecanismo inhibitorio fisiológico del embrión, que impide la emergencia de la radícula.

Garwood (1983), ensaya la germinación de semillas de 22 especies de rubiáceas del bosque tropical estacional de Panamá, utilizando un método general de siembra en suelo sin ningún pretratamiento. De sus resultados el porcentaje de germinación varía entre el 20% y el 100%, de los cuales 5 especies (23%), no presentan latencia, pero 17 (77%) especies las señala el autor con latencia fisiológica.

Beniwal y Singh (1989, en Baskin y Baskin, 1998) trabajando con *Andina cordifolia* y Athaya (1990, en Baskin y Baskin, 1998) con *Mitragyna parvifolia* ambas de la familia Rubiaceae y provenientes del Bosque Tropical Deciduo, reportan la presencia de latencia fisiológica de las semillas.

De acuerdo a las referencias anteriores, el bajo porcentaje de germinación de *H. latiflora*, en la temporada de secas, puede deberse a que sus semillas presentaban latencia fisiológica. Pero es necesario continuar trabajando al respecto para probarlo.

En la temporada de secas/marzo 2007, los frutos derivados de la última floración en la temporada de lluvias del año anterior, habían alcanzado mayor maduración y su coloración era café oscura, a diferencia de los colectados en diciembre de 2006, cuya coloración era verde oscura. Esta característica de los frutos colectados en febrero, repercutió en mayor porcentaje de semillas germinadas, dado que los embriones pudieron alcanzar mejor desarrollo, con niveles hormonales que favorecían este proceso y también por el grado de desecación y maduración que presentaban los frutos y semillas.

Todas las semillas que tienen cierta humedad y generalmente son capaces de germinar óptimamente (Kermode 1995). Pérez *et al.*, (2008) han estudiado semillas que cuando sufren una desecación natural o inducida han incrementado su porcentaje de germinación.

Particularmente en semillas de tomate Cherry (Pérez y colaboradores, 2008) se ha detectado mayor proporción de azúcares en semillas maduras que en semillas jóvenes, así también los niveles de ácido abscísico y de otras hormonas van aumentando o disminuyendo conforme avanza la etapa de crecimiento de la semilla (Bewley y Black, 1978). Estos procesos fisiológicos están ligados directamente con el porcentaje de agua que contiene una semilla, a medida que se incrementa el flujo de salida de agua del fruto, que se torna amarillo y tiene mayor capacidad para germinar (Modi y White, 2004).

En climas secos o áridos, las semillas inmaduras pueden tolerar mejor la deshidratación con aire del ambiente porque la pérdida del agua es más lenta, pero cuando hay aire más caliente ocurre un mayor daño celular y no se reparan completamente los daños estructurales provocados por la desecación (Corbineau *et al.*, 2000).

Lo anterior puede indicarnos que las semillas de Copalche se someten a desecación natural durante el final de la temporada de secas, y que estas últimas tienen mayor crecimiento y maduración, lo cual permite que germinen más cuando aparecen las primeras lluvias. En el presente estudio los frutos colectados en febrero de 2007, tenían semillas que sembradas en marzo de 2007 en condiciones controladas de humedad, presentaron mayor porcentaje de germinación (29%), en comparación en aquellas provenientes de frutos colectados en diciembre de 2006 y sembradas en enero de 2007, donde el porcentaje fue bajo (5%).

Considerando el deterioro que presenta la Bosque Bajo Caducifolio de J. David Tellitud (Santa Rita), Huetamo, Michoacán, cuya vegetación se ha visto perturbada por el crecimiento de terrenos de cultivo, ganadería y urbanización, resulta importante plantear propuestas que contribuyan a detener la pérdida de especies vegetales y recuperar los servicios ambientales y culturales que proporcionan.

El presente trabajo contribuyó en la exploración de diversos métodos de propagación sin tener resultados favorables con la propagación vegetativa. Solo se lograron obtener nuevas plántulas a partir de la germinación de semillas. Aunque el cultivo *in vitro* permitió obtener el mayor porcentaje de germinación de semillas (75%), este procedimiento es costoso, por lo que se recomienda la siembra en suelo de semillas obtenidas de frutos maduros de la temporada de secas en febrero y marzo. Este procedimiento es un método más económico y sencillo de multiplicación de esta especie para los pobladores de esta región y representa un intento de restauración de las zonas perturbadas o al menos de su introducción a los huertos familiares.

En estas condiciones los pobladores por su conocimiento de las propiedades medicinales, cuidarían y ayudarían a mantener la población del Copalche y así los árboles ya existentes se conservarían, dando mayor diversidad vegetal al medio y ayudando a disminuir el deterioro ambiental de la zona.

Al tener este tipo de planta medicinal cerca de la población, permite construir una visión a futuro, es decir este recurso se puede utilizar de forma terapéutica de uso local o incluso de aprovechamiento comercial como venta de la materia prima, sin dañar a la población de Copalche.

9. CONCLUSIONES

- 1) Los experimentos de acodos y estacas mostraron que la especie es difícil de enraizar, debido a que ningún tratamiento se obtuvo formación de raíz, lo cual indica que la concentración de enraizador no fue la indicada o bien que existen otros factores que deben ser evaluados.
- 2) El cultivo *in vitro* permitió obtener mayor número de brotes. Sin embargo tampoco permitió el enraizamiento, con lo que limitó la posibilidad de lograr un mayor número de plantas.
- 3) El cultivo *in vitro* permitió obtener mayor porcentaje (75%) de germinación, pero el procedimiento es costoso. Por lo que, el método más económico y sencillo de multiplicación de esta especie, fue a partir de la emergencia de plántulas de semillas maduras sembradas en suelo, obtenidas de frutos colectados en febrero, cuyas plántulas fueron susceptibles de ser aclimatadas y reintroducidas en J. David Tellitud (Santa Rita), Huetamo, Michoacán.

10. PROPUESTAS

A *Hintonia latiflora* la podemos considerar como una especie de difícil enraizamiento en las condiciones que se llevo a cabo este trabajo, sin embargo, no podemos descartar el enraizamiento de acodos y estacas si se utilizan otros tratamientos.

Se propone modificar las concentraciones del enraizador y su forma de aplicación, esto para tener éxito de obtención de raíces. Particularmente la aplicación de AIB en solución, ya que las soluciones líquidas son más efectivas para promover el enraizamiento de acodos y estacas (Mateo-Sánchez *et al.*, 1998; Bonfil-Sanders, 2007).

En cultivo *in vitro*, la producción de callos fue muy alta, y se podrían hacer futuros ensayos enfocados a la obtención de raíces a partir de estos callos y combinar los resultados con la generación de brotes, para lograr el objetivo de propagación *in vitro*. También evaluar embriogénesis y organogénesis como alternativa.

Para la germinación de semillas se propone: sembrar mayor número de semillas y con esto obtener más plantas y poder introducirlas a campo. Con esto se podrá contribuir a incrementar el número de plantas en la zona.

11. ANEXO

COMPOSICIÓN DE MEDIO DE CULTIVO MS MODIFICADO:

Reactivos:	Cantidad mL:	Cantidad mL:	Cantidad mL:
NH ₄ NO ₃	10	20	15
KNO ₃	7.9	16	12
MGSO ₄ 7H ₂ O	15	30	22.5
KH ₂ PO ₄	12.5	25	19
CA(NO ₃) ₄ H ₂ O	30	60	45
Quelatos	10	20	45
Mioinositol	10	20	15
Tiamina	10	20	15
Micronutrientes a concentraciones normales	10	20	15
AIB*	-	-	-
AIA*	-	-	-
BA*	-	-	-
Sacarosa	30 g	6 g	4.5 g
Agar	6 g	60 g	45 g
pH	5.7	12	9

Medio modificado por Villegas *et al.* (1992). La cantidad de medio dependía del objetivo de cada experimento. Las concentraciones de los reguladores de crecimiento AIB*, AIA* y BA* fueron modificadas de acuerdo al objetivo de cada experimento.

EXPERIMENTO ESTACAS

Cuadro 1. Análisis de Varianza de los tratamientos aplicados a estacas en la temporada de invierno:

Efectos principales	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrados medios	F	P
Enraizador	5.89091	1	5.890909	28.92857	0.000002
Error	10.18182	50	0.203636		

Cuadro 2. Análisis de rango múltiple para el efecto del enraizador sobre el número de brotes en estacas sembradas en la temporada de invierno:

Nivel	Medias de diferencias mínimas significativas (Tukey)	Grupos homogéneos
Aciggib 4%	0.090909	X
Aciggib 2%	0.181818	X X
Aciggib 1%	0.363636	X X
Testigo	0.363636	X X
Radix® 3000	0.636364	X

EXPERIMENTOS CULTIVO *IN VITRO*

EXPERIMENTO 1

Cuadro 3: Análisis de Varianza para el experimento 1 en tubos de cultivo, con diferentes concentraciones de BA (0, 0.1, 0.2, 0.4 mM):

Efectos principales	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrados medios	F	P
Entre tratamientos	3.81579	3	1.27193	1.45	0.2311
Dentro de los tratamientos	129.947	148	0.878023		
Total	133.763	151			

EXPERIMENTO 2

Cuadro 4: Análisis de Varianza de los tratamientos con BA en concentración de 0.1, 0.2 y 0.4 mM, colocados en frasco.

Efectos principales	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrados medios	F	P
Entre tratamientos	0.466667	2	0.233333	0.30	0.7433
Dentro de los tratamientos	21.0	27	0.777778		
Total	21.4667	29			

EXPERIMENTO 3

Cuadro 5: Análisis de varianza respecto al número de brotes obtenidos con AIB, AIA y BA a las concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.4 mM, evaluados en las semanas 2 y 3:

Efectos principales	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrados medios	F	P
Semana	3.9063	1	3.9063	1.843	0.1765
Hormona	13.1688	2	6.5844	3.107	0.0476
Concentración	29.4188	3	9.8063	4.628	0.0040
Error	324.2000	153	2.1190		
Total	370.6938	159			

Cuadro 6: Análisis de rango múltiple para el efecto de la concentración de los reguladores de crecimiento sobre el número de brotes:

Nivel	Conteos	Medias de diferencias mínimas significativas (Tukey)	Grupos homogéneos
1 = Testigo	40	0.7021	X
3 = 0.2	40	1.1271	X X
4 = 0.4	40	1.4271	X X
2 = 0.1	40	1.8771	X

Cuadro 7: Análisis de varianza respecto a la presencia de callos con AIB, AIA y BA a las concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.4 mM, evaluados en las semanas 2 y 3.

Efectos principales	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrados medios	F	P
Semana	0.0563	1	0.0563	0.529	0.4758
Hormona	0.5563	2	0.2782	2.617	0.0763
Concentración	0.3188	3	0.1063	1.000	0.3948
Error	16.2625	153	0.1063		
Total	17.1938	159			

EXPERIMENTO 4

Cuadro 8: Análisis de Varianza de los tratamientos de AIA y AIB a las concentraciones de 0.2, 0.4 y 0.8 mM

Efectos principales	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrados medios	F	P
Hormona	0.5333	1	0.5333	1.061	0.3124
Concentración	1.0666	2	0.5333	1.061	0.3605
Error	13.0666	26	0.5026		
Total	14.6666	29			

RESULTADOS GERMINACIÓN

Cuadro 9. Análisis de Varianza del efecto de las temporadas de invierno y primavera sobre la Germinación semanal de las semillas de Copalche:

Efectos principales	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrados medios	F	P
Semanas de revisión	393.458	1	393.458	3.17078	0.100275
Error	1489.066	12	124.089		

Cuadro 10. Referencias de presencia o ausencia de latencia fisiológica en diferentes especies de la familia Rubiácea, de acuerdo a Baskin y Baskin (1998):

Núm. reportes	Especie	Tipo de vegetación	Tipo de latencia	Referencia:
1	<i>Gardenia carinata</i>	Bosque lluvioso perennifolio	NL	Ng (1973)
2	<i>Gardenia tubifera</i>	Bosque lluvioso perennifolio	NL	Ng (1980)
3	<i>Genipa americana</i>	Bosque lluvioso perennifolio	NL	González (1991)
4	<i>Morinda citrifolia</i>	Bosque lluvioso perennifolio	LF	Ng (1978)
5	<i>Nauclea maingayi</i>	Zonas tropicales y subtropicales	NL	Ng y Asri (1979)
6	<i>Nauclea subdita</i>	Zonas tropicales y subtropicales	NL	Ng y Asri (1979)
7	<i>Randia acuminata</i>	Bosque lluvioso perennifolio	LF	Jones (1956)

8	<i>Randia scortechiniis</i>	Bosque lluvioso perennifolio	LF	Ng (1978)
9	<i>Oldenlandia corymbosa</i>	Zona agrícola anteriormente bosque perennifolio	LF	Corbineau y Come (1980- 1981)
10	<i>Otomeria guineensis</i>	Zona agrícola anteriormente bosque perennifolio	LF	Marks (1983)
11	<i>Alseis blackiana</i>	Bosque subperennifolio	NL	Garwood (1983)
12	<i>Coussarea curvigemmia</i>	Bosque subperennifolio	LF	Garwood (1983)
13	<i>Faramea occidentalis</i>	Bosque subperennifolio	LF	Garwood (1983)
14	<i>Randia armata</i>	Zonas tropicales y subtropicales	NL	Garwood (1983)
15	<i>Tocoyena pittieri</i>	Zonas tropicales y subtropicales	LF	Garwood (1983)
16	<i>Bertiera guianensis</i>	Bosque subperennifolio	LF	Garwood (1983)
17	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	Bosque subperennifolio	LF	Garwood (1983)
18	<i>Hamelia axillaris</i>	Bosque subperennifolio	NL	Garwood (1983)
19	<i>Hamelia patens</i>	Bosque subperennifolio	NL	Garwood (1983)
20	<i>Palicourea guianensis</i>	Bosque subperennifolio	LF	Garwood

				(1983)
21	<i>Posoqueria latifolia</i>	Bosque subperennifolio	NL	Garwood (1983)
22	<i>Psychotria acuminata</i>	Bosque subperennifolio	LF	Garwood (1983)
23	<i>Psychotria chagrensis</i>	Bosque subperennifolio	LF	Garwood (1983)
24	<i>Psychotria deflexa</i>	Bosque subperennifolio	LF	Garwood (1983)
25	<i>Psychotria emetica</i>	Bosque subperennifolio	LF	Garwood (1983)
26	<i>Psychotria furcata</i>	Bosque subperennifolio	LF	Garwood (1983)
27	<i>Psychotria grandis</i>	Bosque subperennifolio	LF	Garwood (1983)
28	<i>Psychotria horizontalis</i>	Bosque subperennifolio	LF	Garwood (1983, 1986b)
29	<i>Psychotria limonensis</i>	Bosque subperennifolio	LF	Garwood (1983)
30	<i>Psychotria marginata</i>	Bosque subperennifolio	LF	Garwood (1983)
31	<i>Psychotria pittieri</i>	Bosque subperennifolio	LF	Garwood (1983)
32	<i>Psychotria racemosa</i>	Bosque subperennifolio	LF	Garwood (1983)

33	<i>Adina cordifolia</i>	Bosque tropical deciduo	LF	Beniwal y Singh (1989)
34	<i>Mitragyna parvifolia</i>	Bosque tropical deciduo	LF	Athaya (1990)
35	<i>Mitracarpus hirtus</i>	Zonas tropicales y subtropicales	NL	Felippe y Polo (1983)
36	<i>Thieleodoxa lanceolata</i>	Zonas tropicales y subtropicales	LF	Rizzini (1965)

NL: No hay latencia; 0-4 semanas de incubación desde su exposición a condiciones de germinación.

LF: Latencia Fisiológica; más de 4 semanas de incubación desde su exposición a condiciones de germinación.

12. REFERENCIAS

- Aguilar, E., Camacho, J. R., Chino, S., Jáquez, P. y M. E. López. 1994. Herbolaria Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. México
- Alcántara-Flores Ela. 2006. Estructura e histoquímica de la lámina foliar y propagación vegetativa de *Phyllomona laticuspis* especie medicinal. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Alegre, J., J.L. Toledo, A. Martínez, O. Mora y E.F. De Andrés. 1998. Rooting ability of *Dorycnim* spp. *Scientia Horticulturae* 76: 123-129.
- Anales del Instituto médico Nacional (AIMN). 1984. Oficina Tipográfica de la Secretaria de Fomento. 218.
- Anaya Dávila-Gabiri Ma. Isabel. 1991. Estudio etnobotánico del complejo Quina en México. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM, México.
- Aparicio Rentería, A.; V. Rebolledo Camacho y H. Cruz Jiménez. 2006. Multiplicación clonal de *Pinus jaliscana* Pérez de la rosa a través de la técnica de enraizamiento de estacas. *Foresta Veracruzana* 8 (2): 19-26
- Argotte-Ramos R., Ramírez-Ávila, G., Rodríguez-Gutiérrez, M.C., Ovilla-Muñoz, M., Lanz-Mendoza, H., Rodríguez, M., González-cortázar, M., Álvarez, L. 2006. Antimalarial 4-phenylcoumarins from the stem bark of *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products*. 69: 1442-1444.
- Argueta, A. V., Cano, L. y Rodarte, M. E. (editores) 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México.
- Barajas-Morales, J. y León, G. 1989. Anatomía de Maderas de México: Especies de una Selva Baja Caducifolia. Instituto de Ecología, UNAM
- Barretto, Pereira, A., Pascal, M., Sousa Riberio, L., Guimarães Mendes, A.N y E. Resende. 2002. Enraizamiento de estacas de *Coffea arabica* L. em diferentes substratos. *Ciênc. agrotec., Lavras*. 26(4): 741-748.
- Baskin, C. C. y Baskin, J. M. 1998. *Seeds*. Academic Press USA.
- Bewley, J.D. y M. Black. 1978. *Physiology and Biochemistry of Seeds*. Springer-Verlag. New York. 88-101 pp.
- Bnouham, M., Ziyyat, A., Mekhfi, H., Tahri, A., Legssyer, A. 2006. Medicinal plants with potencial antidibetic activity: a review of ten years of herbal medicine (1990-2000). *International Journal of Diabetes and Metabolism*. 14: 1-25.
- Bonfil-Sanders, C., Mendoza-Hernández, P.E. y J.A. Ulloa-Nieto. 2007. Enraizamiento y formación de callos en estacas de siete especies del género *Brusera*. *Agrociencia* 41:103-109.
- Borhidi, Attila. 2006. *Rubiáceas de México*. Akadémiai Kiadó. Hungría. 340 p.
- Brechú Franco, A. E. 2008. ¿Cómo propagar árboles que se usan en medicina tradicional? Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Bye, R.A. 1986. Medicinal plants of the Sierra Madre: comparative study of Tarahumara and Mexican market plants. *Economic Botany*. 40: 103-124.
- Bye, R., Linares, E., Flores, P. 1992. Selección de plantas medicinales de México. Noriega Editores. México. 125 p.

- Cid de la Torre, Karla S. 2008. Propagación Sexual de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*), especie de uso medicinal. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Corbineau F. Picard MA, Fougereux JA, Ladonne F, Côme D. 2000. Effects of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seeds as related to oligosaccharide content and cell membrane properties. *Seed Sci. Res.* 10: 329-339.
- Corner, E. J. H. 1976. The Seeds of Dicotyledons. Volume. 1. Cambridge University Press. Cambridge. 156 pp.
- Cristians Niizawa, S. 2009. Investigación Farmacológica y Clínica de las hojas de *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño EX DC.) Bullock Rubiaceae: Una contribución para la elaboración de una monografía tipo OMS. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Cristians, N. S., Guerrero-Analco J.A., Pérez-Vásquez A., Palacios-Espinoza F., Ciangherotti C., Bye R. y Mata R. 2009. Hypoglycemic activity of the extracts and compounds from the leaves of *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana*: Potential alternatives to the use of the stem bark of these species. *Jouenal ord Natural Products.* 72: 408-413.
- Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Ángeles-López, G.E., Navarrete, A., Mata, R. 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology.* 110: 334-342.
- De León García, M.W. 2003. Respuesta al cultivo in vitro de cuatro variedades de Alcachofa (*Cynara scolymus* L.) Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. Guatemala.
- Diaz, J.L. (editor). 1976. Usos de las plantas medicinales de México: monografías científicas I y II. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales. México. 358 y 329 p.
- Díaz Rodríguez, B. 2007. Propagación de *Thelocactus rinconensis* (Poselger) Britton y Rose (Cactaceae) especie endémica amenazada. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Dodds J. H. y L.W. Roberts. 1982. *Experiments in Plant Tissue Culture.* Cambridge University Press. Cambridge. 178 pp.
- Domínguez Rosales, M.S., Alpuche Solís, A.G., Vasco Méndez, N.L. y E. Pérez Molphe Balch. 2008. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana A.C.* 31(4): 317-322.
- Durán-García, R., M. Méndez y R. Orellana. 1997. Manual de propagación de plantas nativas de la península de Yucatán. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Mérida, México.
- Enríquez del Valle, J.R., Carrillo Castañeda, G. y Rodríguez de la O. 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado in vitro de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana A.C.* 28(2): 175-178.
- Espinoza, E. J. R. 1987. Enraizamiento de estacas de Guayaba. Colegio de Posgraduados, Estado de México, México

- Feria, M., Jiménez, E., Barbón, R., Capote, A., Chávez, M. y El. Quiala. 2003. Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 72: 1-6.
- Ferguson, J; Young, M. and Halvorson, J. 1985. The propagation of citrus rootstocks by stem cuttings. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 98: 39-42.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). México DF. P. 139.
- Garwood, N.C. 1983. Seed Germination in a Seasonal Tropical Forest in Panama: A Community Study. *Ecological Monographs*. 53 (2): 159-181.
- Gaspar T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. Reid y t. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant regulators in plant tissue culture. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 32: 272-289.
- Gentry, H.S. 1942. Río Mayo Plants: a study of the flora and vegetation of the Valley of the Río Mayo, Sonora. Carnegie Institution of Washington. E.U.A. 328 p.
- González, R.H., Ramos, A.C., Camarillo, I.B. y H. Silos. 2000. Biotecnología Vegetal. Manual de Cultivo de Tejidos. Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria. México. 133 pp.
- González, M.E., Ramos, R. y N. Santana. 2000. Efecto del ácido abscísico (ABA) en la regulación del desarrollo de embriones somáticos de *Coffea canephora* P. Var Robusta. *Cultivos Tropicales* 21(3): 33-37. Cuba.
- Hartmann, H. T., D.E. Kester, F. T. Davies, Jr. Y R. L. Geneve. 1997. *Plant Propagation: Principles and Practices*. Sexta Edición. Prentice Hall. New Jersey. U.S.A.
- Hermoso-Gallardo, L. y A. Menéndez-Yuffá. 2000. Multiplicación masiva del café (*Coffea arabica* L. cv. Catimor) mediante cultivo de suspensiones celulares embriogénicas. *Acte científica Venezolana*. 51(2): 90-95.
- Hersch, P. 1999. Destino Común: los recolectores y su flora medicinal. Colección Biblioteca del Instituto Nacional de Antropología e Historia. 1ª reimpresión. México. 262 pp.
- Iglesias, G. L., Prieto, A. José y B. M. Alarcón. 1996. La propagación vegetativa de plantas forestales. *Ciencia Forestal en México*. México (21) 79: 15-37.
- Jaen, S. M. A. 1998. Fluctuación de carbohidratos y efecto de auxinas sobre el enraizamiento de los portainjertos, citrange Carrizo y Troyer. Colegio de Posgraduados, Estado de México, México.
- Jiménez, E. 1998. Generalidades del Cultivo *in vitro*. En: J. N. Pérez (Ed.) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de Plantas. Villa Clara. P: 13-22.
- Kermode, AR. 1995. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination between the embryo and the seed environment. En Kigel j. Galili (Eds) *Seed Development and Germination*. Dekker. Nueva York, EEUU. Pp. 273-332.
- Khan, A.A. 1982. *The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination*. Elsevier Science Publishings Company Inc. The Netherlands. Amsterdam

- Landa, E. 1913. Estudio del Copalchi de Jojutla (*Coutarea latiflora*). Anales del Instituto Médico Nacional: tomo XII, número 4. Secretaria de Instrucción Pública y Bellas Artes. 146-158.
- Latsague, V. M y J. Lara G. 2003. Fenoles solubles totales y su relación con la inhibición de la rizogénesis en estacas de *Nothofagus pumilio* (Poepp.et Endl.) Krasser, Gayana Bot. Vol. 60 (2): 90-93. Chile.
- Loaeza, A. 1906. Informes de los trabajos realizados del mes de enero al mes de noviembre de 1906. Anales del Instituto Médico Nacional: tomo VIII. Oficina Tipográfica de la Secretaria de Fomento. 408, 510.
- Loaeza, A. 1907. Informes de los trabajos realizados del mes de enero al mes de noviembre de 1907. Anales del Instituto Médico Nacional: tomo VIII. Oficina Tipográfica de la Secretaria de Fomento. 178.246.
- Loaeza, A. 1908. Informes de los trabajos realizados del mes de enero al mes de junio de 1908. Anales del Instituto Médico Nacional: tomo X. Secretaria de Instrucción Pública y Bellas Artes. 154-155.
- Longman, K. T., R. H. F. Wilson. 1993. Tropical Trees: Propagation and Planting Manuals, Vol.1, Tropical Trees. Commonwealth Science Council, London.
- Malda G., H. Suzán y R. Backhaus. 1999. In Vitro culture as a potencial method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. Scientia Horticulturae 81 (1): 71-87.
- Márquez, C., Lara, O. F., Esquivel, R.B. y Mata, E. R. 1999. Plantas Medicinales de México II Composición, Usos y Actividad Biológica. UNAM. México.
- Martínez-Bonfil, B. P.; G. Salcedo-Morales; M. M. López-Hernández y A. R. López-Laredo. 2005. Inducción de callo de Cempaxúchil *Tagetes erecta*, Var. „Crackerjack con diferentes reguladores de crecimiento y tres tipos de explantes. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México.
- Martínez, M. 1989. Las plantas medicinales de México. Ed. Botas. México. 656 p.
- Martínez, M.A. y J.C. Pacheco. 2006. Protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker. Agronomía Colombiana. 24(2): 207-213.
- Martínez Pastur, G. y Arena, M. 1997. Micropropagación de *Nothofagus pumilio* (Poepp. Et Endl.) Krasser. Bosque 18 (2): 43-50.
- Mata R., Del Rayo Camacho, M., Cervera, E., Bye, R., Linares E. 1990. Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*. Phytochemistry. 29: 2037-2040.
- Mata R., Del Rayo Camacho, M., Mendoza, S., Del Carmen Cruz, M. 1992. A phenylsterene from *hintonia latiflora*. PPhytochemistry. 31, 3199-3201.
- Mateo-Sánchez, J. J., J. Vargas-Hernández, M. C. López Peralta, y J. Jasso Mata. 1998. Enraizado de estacas juveniles en cinco especies de coníferas ornamentales: efecto de ácido indolbutírico AIB y de la temperatura. Revista Ciencia Forestal en México. 23:29-38.
- Melvin, J. 1998. Fluctuación de carbohidratos y efecto de auxinas sobre el enraizamiento de los portainjertos Citrange Carrizo y Troyer. Tesis de Maestría en Ciencias. Fruticultura. Colegio de Postgraduados. p 122.
- Mociño, J. M. 1802. Extracto del discurso que dijo D. Joseph Mariano Mociño en la apertura de las lecciones de botánica en México. Anales de Historia Nacional 1799-1804: tomo III, número 15. comisión Inertministerial de Ciencia y Tecnología. 288-296.

- Modi, AT., White, BJ. 2004. Water potential oh cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) placenta and seed germination in response to desiccation durind fruit development. Seed Sci. Res. 14: 249-247.
- Moratinos, P.; E. Flores; Á. Gómez y M. Ramírez-Villalobos. 2008. Nota Técnica: Enraizamiento de estacas de semeruco (*Malpighia glabra* L. y *M. emarginata* Sessé & Moc. Ex D.C.). Rev. Fac. Agron. (LUZ). 25: 405-420.
- Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue cultura. Physiologia Plantarum 15: 473-479.
- Naranjo Chávez, G. 1986. Ensayo de Propagación Vegetativa de Cirimo (*Tilia mexicana* Schlecht). Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Bosques. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán. México.
- Nicasio, P.; Ma. L. Garduño, V. M. Chávez y F. Cruz Sosa. 2005. Generación de cultivos *in vitro* de *Cecropia obtusifolia* como fuentes productoras de compuestos hipoglucemiantes. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México.
- Niembro Rocas, A. 1989. Semillas de Plantas Leñosas Morfología comparada. Limusa Noriega. México. 1º Edición. p 165
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 2006. Estrategias de Cooperación: información México. www.who.int/countries/mex
- Organización Panamericana de la Salud. Vigilancia, Prevención y Control De Enfermedades www.mex.ops-oms.org
- Parada Ponce, D.M. y Villegas Monter, A. 2009. Propagación *in vitro* del híbrido Almendro x Durazno H1. Revista Fitotecnia Mexicana A.C. 32(2): 103-109.
- Parra Gutierrez, D. 1976. Propagación vegetativa del tamarindo (*Tamarindus indica* L). Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia. Escuela Nacional de Agricultura Chapingo, México.
- Pedroza-Manrique, J.A. 2009. Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones *in vitro*. Rev. Colomb. Biotecnol. 11(1): 17-32.
- Pérez, I., González, V., Molina, J., Ayala, O. y A. Peña. 2008. Efecto del desarrollo y secado de semillas de *Physalis ixocarpa* Brot. en germinación, vigor y contenido de azúcares. INTERCIENCIA. 33 (10): 762-766.
- Perez G. y J. Martínez. 1994. Introducción a la fisiología vegetal. Madrid: Mundi-Prensa.
- Pérez-Molphe-Balch, E, M. E. Pérez, E. Villalobos, E. Meza, L. del R. Morones y H. J. Lizalde. 1998. Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 34: 131-135.
- Phillips R. L., S. M. Kaeppler y P. Olhoft. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos. 91 (12): 5222-5226.
- Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi-Prensa. Madrid.
- Pliego-Alfaro, F.; A. Berceló-Muñoz; E. Simón-Pérez; G. de la Viña-nieto; C. Sánchez-Romero y R. Perán-Quesada. 1999. La micropropagación en la mejora de

patrones de Aguacate (*Persea americana* Mill.): problemas y limitaciones. Revista Chapingo Serie Horticultura 5: 239-244. México.

- Razdan, M. 2003. Introduction to Plant Tissue Culture. Segunda Edición. Science Publishers, Inc. Enfield. 375 pp.
- Reguero, M.T., Mata, R., Bye, R., Linares, E., Delgado, G. 1987. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine: cucurbitacines from *Hintonia latiflora*. Journal of Natural Products. 50: 315-316.
- Ríos L. D.; F. Avilés M.; M. Sánchez-Olate; R. Escobar R. y G. Pererira C. 2005. Variación de la tasa de enraizamiento asociada al número de subcultivo y diámetro de microtallos de castaño *Castanea sativa* Mill. Agricultura Técnica (Chile) 65 (3): 258-264.
- Roca, W. M., Mroginski, L. A. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali. CIAT.
- Rojas, M. 1993. Fisiología vegetal aplicada. 4 ed. McGraw-Hill. México.
- Rojas, M., Ramírez, H. 1987. Control hormonal del desarrollo de las plantas. Limusa. México.
- Rodríguez Larramendi, L.A. 2002. Efecto eco-fisiológico de diferentes niveles de irradiancia en la productividad biológica y agrícola del cafeto (*Coffea arabica* L.) en ecosistemas típicos de la Sierra Maestra. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Facultad de Agronomía. Universidad Agraria de La Habana “Fructuoso Rodríguez Pérez”. La Habana. Cuba.
- Rzedowski, J. 1994. Vegetación de México. Limusa Noriega Editores. México. 6ª reimpresión. 432 p.
- Sahagún, B. (1540-1585) 1988. Historia general de las cosas de Nueva España: primera versión íntegra del texto castellano del manuscrito conocido como Códice Florentino. Introducción, glosario y notas de Alfredo López Austin y Josefina García Quintana. Alianza Editorial. España.
- Salcedo, G. J. G. 1985. Propagación vegetativa del Mamey. Colegio de Posgraduados, Estado de México, México.
- Salisbury, B. y W. Ross. 1994. Fisiología vegetal. Iberoamericana. México.
- Sánchez-Morán, M.R. y E. Pérez-Molphe-Balch. 2007. Propagación *in vitro* de *Browningia candelaris* (Cactaceae) usando metatopolina. Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas. 4(2):16-18 p.
- Santelices, R. y A. Cabello. 2006. Efecto del ácido indolbutírico, del tipo de la cama de arraigamiento, del substrato, y del árbol madre en la capacidad de arraigamiento de estacas de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. Revista Chilena de Historia Natural. 79: 55-64.
- Srivastava, L.M. 2002. Plant Growth and Development: hormones and environment. Academic Press, Elsevier Science. 1º Edición. USA. 772 pp.
- Tacoronte, M., Vielma, M., Mora, A. y C. Valecillos. 2004. Propagación *in vitro* de Caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de yemas axilares. Acta Científica Venezolana, 55: 7-12.
- Taiz L. y E. Zeiger. 2002. Plant Physiology. Sinauer. Associates, Inc., Publishers. 3º Edición. U.S.A. 690 pp.
- Terres, J. 1913. Informe rendido por el Director del Instituto a la Secretaria de Instrucción Pública y Bellas Artes de los trabajos realizado por el establecimiento

del 1 de julio de 1911 al 31 de diciembre de 1912. Anales del Instituto Médico Nacional: tomo XII, número 3. Secretaría de Instrucción Pública y Bellas Artes. 104, 109, 118, 129.

- Vázquez-Yanes, C., A. Orozco, M. Rojas, M.E. Sánchez y V. Cervantes. 1997. La reproducción de las plantas: Semillas y meristemos. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 167 pp.
- Villegas M. A., C. Mazuelos, M. Cantos y A. Troncoso. 1992. Influencia del nitrógeno sobre el desarrollo *in vitro* del portainjerto de vid 161-49. Suelo y Planta. 2 (4): 529-539.