



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

---



**FACULTAD DE INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA  
DE LA MADERA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**CRECIMIENTO Y DESARROLLO EN PLANTAS DE  
*Tilia americana* var. *mexicana* (SCHTDL.) HARDIN  
PROPAGADAS *in vitro* E INVERNADERO**

**TESIS**  
que presenta:

**WENDY ZURITA VALENCIA**

como requisito para optar por el grado de:  
**MAESTRA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA MADERA**

Director de tesis: **DR. NAHUM SANCHEZ VARGAS**  
Director de tesis: **DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA**

Morelia, Michoacán, Agosto de 2012

---

## **DEDICATORIA**

*Este trabajo se lo dedico a mi Familia, gracias por estar siempre que los he necesitado, los quiero mucho.*

*A mis padres: Ramiro Zurita Pintor e Irma Valencia Alcantar.*

*A mis hermanos: Marisol, Fredy, Rosalinda y Leslie.*

*A mis sobrinos: Aarón y Fátima*

*A Dios.*

*Y a todos mis amigos gracias por estar siempre pendientes de mi trabajo.*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por hacerme de una identidad nicolaita.

A la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera, por permitirme desarrollar nuevas bases, durante mi formación como Maestra en Ciencias en Tecnología de la Madera.

Al Dr. Pablo López Albarrán Jefe de División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera y al Coordinador de la misma, el Dr. Jorge Enrique Ambriz Parra, por el apoyo para concluir con mis tramites, en el tiempo establecido, gracias.

Al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, por el apoyo con el uso de sus instalaciones.

Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal, por permitirme nuevamente desarrollar mi investigación de tesis, por proporcionarme todos los materiales y equipos necesarios para concluir mi trabajo

A la mesa de sinodales integrada por el Dr. Nahum M. Sánchez Vargas, Dr. Rafael Salgado Garciglia, Dr. José Cruz de León, Dr. Alejandro Martínez Palacios y al Dr. Jorge Enrique Ambriz Parra,

gracias por sus revisiones y aportaciones a este trabajo que hoy se puede ver concluido.

Quiero agradecer especialmente a mis Directores de Tesis, en primera instancia al Dr. Nahum M. Sánchez Vargas, por aceptarme como su estudiante de Maestría, por el tiempo y esfuerzo para concluir este trabajo. Al Dr. Rafael Salgado Garciglia, porque es la segunda ocasión que me acompaña en mi formación, primero como Bióloga y hoy como Maestra en Ciencias en Tecnología de la Madera, la verdad faltan las palabras para con usted Dr. Rafael, pero MUCHAS GRACIAS, por todo su tiempo, paciencia, dedicación y esfuerzo.

También un agradecimiento a la Biól. Alejandra Hernández García, por su asesoría durante mi estancia en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Al igual que a mis compañeros tesisistas, del mismo laboratorio, fue muy grato convivir con ustedes, Yoshi, Rafa, Rodo, Cristobal, Edgar, Luis y especialmente Elmar, que me ayudo con las *Tilias*.

Agradezco a la M.C. Ma. Carmen León Cárdenas y al Dr. Javier Cruz Mandujano, por estar siempre pendientes, de mi trabajo de investigación.

Finalmente quiero agradecer a dos nuevas personas, que conocí durante la Maestría y que son muy importantes, ustedes saben a qué me refiero, Estelita y Verónica gracias por su apoyo.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice de Cuadros	
Índice de Figuras	
Resumen	
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
<b>2.1. CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD VEGETAL</b>	<b>5</b>
2.1.1. Cuantificación de la variación genética	8
2.1.1.1. Conservación de especies o poblaciones amenazadas	9
<b>2.2. PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN</b>	<b>9</b>
2.2.1. Propagación por semilla deseán	9
2.2.2. La biotecnología en la conservación	11
2.2.3. Micropropagación de especies arbóreas	13
2.2.4. Conservación <i>in vitro</i>	15
<b>2.3. GENERALIDADES DE <i>Tilia</i></b>	<b>17</b>
2.3.1. <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> (Schltdl.) Hardin	18
2.3.1.1. Distribución de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i>	18
2.3.1.2. Usos de <i>Tilia</i> en México	21
2.3.1.3. Situación ecológica	22
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>24</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>25</b>
<b>4.1. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>25</b>
<b>5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>62</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>27</b>
<b>CAPITULO I.</b>	<b>28</b>
Características de sitios de colecta de semillas y de los árboles de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> , en el estado de Michoacán, México.	
<b>CAPITULO II.</b>	<b>36</b>
Germinación del cirimo ( <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> ) (Tiliaceae) bajo cultivo <i>in vitro</i> e invernadero.	
<b>CAPITULO III.</b>	<b>53</b>
Desarrollo de plantas de cirimo ( <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> ) (Tiliaceae) bajo cultivo <i>in vitro</i> e invernadero.	
<b>CAPITULO IV.</b>	<b>76</b>
Micropropagación del cirimo ( <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> ) (Tiliaceae) por el cultivo de yemas axilares	
<b>7. DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>92</b>
<b>8. CONCLUSION GENERAL</b>	<b>96</b>
<b>9. LITERATURA ADICIONAL</b>	<b>97</b>
<b>10. ANEXO ACUSE DE RECIBIDO DE PUBLICACIÓN</b>	<b>104</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

		Página
<b>ANTECEDENTES</b>		
Cuadro 1.	Clasificación botánica de <i>Tilia americana</i> var. mexicana (Brands, 2008).	19
<b>RESULTADOS</b>		
<b>CAPÍTULO I</b>		
Cuadro 1.	Número y características de los árboles de <i>Tilia americana</i> var. mexicana seleccionados para la colecta de semillas en los diferentes sitios de Michoacán, México.	33
<b>CAPÍTULO II</b>		
Cuadro 1.	Ubicación en el Estado de Michoacán de los cuatro sitios donde se realizaron las colectas de los frutos de <i>Tilia americana</i> var. mexicana.	39
Cuadro 2.	Número (#) y porcentaje (%) de frutos colectados y semillas obtenidas de <i>Tilia americana</i> var. mexicana en cuatro sitios de Michoacán, México.	43
Cuadro 3.	Porcentajes de germinación de <i>Tilia americana</i> var. mexicana con respecto al total de frutos colectados en cuatro sitios de Michoacán.	48
<b>CAPÍTULO III</b>		
Cuadro 1.	Variables evaluadas, unidades de evaluación y simbología utilizada en cada condición de evaluación.	57
Cuadro 2.	Valores promedio de las variables evaluadas en cada condición de desarrollo, edad de medición y localidad de colecta de <i>Tilia americana</i> var. mexicana.	60
Cuadro 3.	Cuadrados medios (C.M.) y significancia (P>F) de los análisis de varianza entre localidades de muestreo de <i>Tilia americana</i> var. mexicana para cada condición de desarrollo y edad de medición.	62
Cuadro 4.	Valores de correlación entre las características medidas para la condición de desarrollo de invernadero a los 30 (arriba de la diagonal) y los 60 (debajo de la diagonal) días de medición.	66
Cuadro 5.	Valores de correlación entre las características medidas para la condición de desarrollo de invernadero a los 90 (arriba de la diagonal) y los 120 (debajo de la diagonal) días de medición.	67

Cuadro 6.	Valores de correlación entre las características medidas para la condición de desarrollo de invernadero a los 150 (arriba de la diagonal) y los 180 (debajo de la diagonal) días de medición.	68
Cuadro 7.	Valores de correlación entre las características medidas para la condición de desarrollo de <i>in vitro</i> a los 30 (arriba de la diagonal) y los 60 (debajo de la diagonal) días de medición.	68
Cuadro 8.	Valores de correlación entre las características medidas para la condición de desarrollo de <i>in vitro</i> a los 90 (arriba de la diagonal) y los 120 (debajo de la diagonal) días de medición.	69
Cuadro 9.	Valores de correlación entre las características medidas para la condición de desarrollo de <i>in vitro</i> a los 150 (arriba de la diagonal) y los 180 (debajo de la diagonal) días de medición.	70
<b>CAPÍTULO IV</b>		
Cuadro 1.	Tratamientos pre-germinativos (escarificación) en semillas de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> para la germinación <i>in vitro</i> .	80
Cuadro 2.	Influencia del ácido indolbutírico (AIB) sobre el número y tamaño de raíces en brotes micropropagados de <i>Tilia mexicana</i> . A los 45 días del cultivo.	85
Cuadro 3.	Respuesta <i>in vitro</i> en yemas apicales de plántulas de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> de semillas de tres sitios de colecta (Ichaqueo, Paracho y Tancítaro), a los 60 días del cultivo	86

## ÍNDICE DE FIGURAS

Página

### ANTECEDENTES

Figura 1. Árbol de *Tilia americana* var. *mexicana* (Schltdl.) Hardin (A) y algunas partes características: Hoja (B), Flores (C), Frutos (D) y Semillas (E). 19

Figura 2. Distribución natural a nivel nacional de *Tilia americana* var. *mexicana* (Pavón y Rico-Gray, 2000). 20

### RESULTADOS

#### CAPITULO I

Figura 1. Ubicación geográfica del Municipio de Morelia y sitio de colecta (●) de *Tilia americana* var. *mexicana* (INEGI, 2005; Clave geoestadística 16053, 2009). 28

Figura 2. Ubicación geográfica del Municipio de Paracho y sitio de colecta (●) de *Tilia americana* var. *mexicana* (INEGI, 2005; Clave geoestadística 16065, 2009). 29

Figura 3. Ubicación geográfica del Área de Protección de Flora y Fauna Pico de Tancítaro y sitio de colecta (●) de *Tilia americana* var. *mexicana* (INEGI, 2005; Clave geoestadística 16083, 2009). 31

Figura 4. Ubicación geográfica de Tumbiscatío y sitio de colecta (●) de *Tilia americana* var. *mexicana* (INEGI, 2005; Clave geoestadística 16096, 2009). 32

Figura 5. Árboles de *Tilia americana* var. *mexicana* fuente de semillas colectadas de cada sitio. A) Ichaqueo; B) Paracho; C) Tancítaro; D) Tumbiscatío. 34

#### CAPITULO II

Figura 1. Comparación entre el número de frutos colectados y el número de semillas obtenidas después del proceso de selección de *Tilia americana* var. *mexicana* (Semillas de sitio de colecta de Paracho). 42

Figura 2. Porcentaje de germinación de semillas de *T. americana* var. *mexicana* en condiciones de cultivo de invernadero. 44

Figura 3.	Plántulas de <i>T. americana</i> var. <i>mexicana</i> germinadas en invernadero (150 días de cultivo) (A) y en cultivo <i>in vitro</i> : Rompimiento de testa, 30 días de cultivo (B); Emergencia de radícula y desarrollo de hojas cotiledonares, 60 días de cultivo (C); Plántula de 90 días de cultivo (D).	45
Figura 4.	Porcentaje de germinación total (T1, T2 y T3) de semillas de <i>T. americana</i> var. <i>mexicana</i> en condiciones de cultivo <i>in vitro</i> , por sitio de colecta durante 90 días.	46
Figura 5.	Porcentajes de germinación en semillas cultivadas <i>in vitro</i> por la siembra de una semilla (T1), 3 semillas (T2) y 5 semillas (T5) de cada uno de los sitios de colecta, a los 90 días del cultivo.	47
<b>CAPITULO IV</b>		
Figura 1.	Micropropagación de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> por cultivo de yemas axilares: A) Plántula germinada <i>in vitro</i> (90 días de cultivo); B) Multiplicación de brotes en yema axilar (60 días de cultivo); C) Brote micropropagado sometido a enraizamiento; D) Plántulas micropropagadas de 45 días; E) Plántulas de 90 días cultivadas en invernadero.	83
Figura 2.	Influencia de ANA/BA en la multiplicación <i>in vitro</i> de brotes en yemas axilares de <i>Tilia mexicana</i> : Número de brotes (■); Longitud de brotes (□). Datos representan el promedio ± error estándar. A los 60 días de cultivo. *Diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ), de acuerdo a prueba de Tukey.	84

## RESUMEN

La presente investigación es una contribución, al estudio de la germinación, desarrollo inicial y micropropagación de *Tilia americana* var. *mexicana* (Schltdl.), especie sobreexplotada por su madera y flores, categorizada en peligro de extinción, en Michoacán por la NOM-059-ECOL-2010. Para este trabajo, se germinaron semillas de *Tilia*, de cuatro localidades (Ichaqueo, Paracho, Tancítaro y Tumbiscatío), bajo dos condiciones de cultivo, *in vitro* e invernadero, posteriormente se determinando los porcentajes germinación cada 30 días. Mostrando en invernadero un 15.5 % de germinación T1 (5 semillas por maceta), a los 90 días, en Tumbiscatío, lo que llevo a replantear la condición *in vitro*, realizando 3 tratamientos, obteniendo hasta un 100% de germinación en el T1 (1 semillas por frasco) a los 30 días, para Tumbiscatío. Las plantas obtenidas se trasplantaron en frascos y macetas respectivamente, para cada condición, y localidad, realizando mediciones de parámetros cada 30 días, durante 180 días. Observando en invernadero, para Tumbiscatío e Ichaqueo promedio un desarrollo mayor a los 180 días de edad, en la altura del tallo, área foliar y longitud de raíz, en comparación con Paracho y Tancítaro, donde el desarrollo fue menor, pero mayor en número de hojas. A su vez deja ver una alta significancia entre las localidades de colecta ( $P < 0.013$ ), durante todo el período de evaluación, a demás de presentar la longitud de raíz, relación con la mayoría de los parámetros. Para *in vitro* Tumbiscatío e Ichaqueo, tienen mayor altura de tallo, número de raíces secundarias y longitud de raíz. Solamente en el número de hojas Tancítaro y Paracho presentan un mayor número. Presentando una altamente significativas entre las localidades de colecta ( $P < 0.0012$ ), durante los 180 días. La micropragación se consiguió a partir de yemas axilares, mostrando hasta un 70 % de supervivencia. El mayor número de brotes, se logró con la adición de ANA. Con este trabajo se puede apreciar como la condición *in vitro* es mucho más favorable para el germinación y micropropagación de *Tilia*, aunque no tanto para su desarrollo ya que, las plantas tienen condiciones de crecimiento totalmente controladas y en la aclimatación en invernadero pueden morir altos porcentajes.



## 1. INTRODUCCIÓN

En el Estado de Michoacán, México, las plantas de importancia forestal están seriamente amenazadas por la destrucción de bosques y selvas y por su explotación como fuente de madera para la elaboración de muebles, casas, artesanías e instrumentos musicales, haciendo vulnerables a los recursos que aún prosperan en forma silvestre, de tal manera que están incluidas como plantas en riesgo de desaparición en la Norma Oficial Mexicana de Ecología (NOM-059-ECOL-2010) (SEMARNAT, 2010).

La especie *Tilia americana* var. *mexicana* (Schltdl.) J. W. Hardin [sinónimo: *Tilia mexicana* (Schltdl.)] conocida como cirimo en Michoacán, es muy apreciada principalmente por su madera. Es un árbol que a través de los años ha sufrido una intensa explotación por el hombre, a tal grado que actualmente es muy difícil de encontrar en estado silvestre un afloramiento vegetal importante, además de que se reportan porcentajes de germinación y viabilidad de semillas por debajo del 15% (García-Magaña, 1994).

Es una especie catalogada como en peligro de extinción (PE) por la norma oficial mexicana de ecología, donde se especifica como una planta endémica de México (NOM-ECOL-059-2010) (SEMARNAT, 2010). Esta especie forma parte del estrato arbóreo del bosque mesófilo de montaña, el cual es uno de los tipos de vegetación que cubren menor área (1% del territorio nacional) e históricamente más perturbados de México (Williams-Linera *et al.*, 1990; Pavón y Rico-Gray, 2000).

En Michoacán, *T. mexicana* se ha explotado de manera irracional principalmente para el uso de su madera en la elaboración de artesanías y a la colecta de sus flores con fines medicinales, la infusión de las flores (té de tila) es utilizada como calmante nervioso (Pavón y Rico-Gray, 2000). Lo anterior ha resultado en la disminución de las poblaciones y un número muy bajo de individuos pueden aún

encontrarse en algunos bosques michoacanos, como en el bosque mesófilo de montaña, en sitios húmedos como cañadas y orillas de arroyos en los bosques de pino-encino, de encino y también de algunos matorrales subtropicales, como en Tumbiscatío, San Juan Nuevo Parangaricutiro, Pátzcuaro, Cherán, Pichátaro y Morelia, entre otros sitios (Pérez-Calix, 2009).

A pesar de su importancia y problemática que sufre este árbol, existen pocos antecedentes sobre *T. americana* var. *mexicana* que contengan información sobre su propagación para su cultivo en invernadero y mucho menos en plantaciones. García-Magaña (1994) reporta que las semillas de esta especie muestran porcentajes de germinación menores al 50% y el enraizado de estacas se ha logrado muy recientemente (Muñoz-Flores *et al.*, 2011).

Existen programas que tienen como principal objetivo el evitar la pérdida de especies vegetales, para salvaguardar la fuente natural de variación genética, cuyo estudio es de importancia no solo para la conservación sino también para la propagación masiva. El implementar métodos de propagación con altos porcentajes de germinación o mediante la reproducción asexual y llevar a cabo el cultivo en invernadero y campo, son medidas muy importantes y necesarias para disminuir el riesgo de extinción de una especie vegetal.

La propagación en invernadero y en cultivos *in vitro* por la siembra de semilla, con estudios de crecimiento y desarrollo en ambos sistemas de cultivo, deben realizarse con especies como *T. americana* var. *mexicana*, para generar conocimiento encaminado fundamentalmente a la propagación masiva y conservación. Además, los cultivos *in vitro* son una alternativa para la propagación clonal (micropropagación) de individuos seleccionados, útiles para la realización de plantaciones comerciales (Pérez-Molphe *et al*, 1999).

Por ello, en la presente investigación se determinaron parámetros cuantitativos como porcentaje de germinación, crecimiento y desarrollo, mediante la siembra

de semillas de árboles silvestres provenientes de 4 comunidades del Edo. de Michoacán, así como el establecimiento de la micropropagación por yemas axilares, con el fin de entender los factores importantes para su cultivo que lleven a una propuesta para la propagación y conservación de *T. americana* var. *mexicana*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD VEGETAL

Según Heywood (1978), existen más de 250 mil especies de plantas vasculares, de las cuales más de la mitad se encuentran en las regiones tropicales del mundo y particularmente en México, donde la diversidad presenta niveles muy altos.

La topografía de la República Mexicana es una de las más accidentadas, ya que el gradiente altitudinal va desde el nivel del mar hasta más de 5,000 msnm (Rzedowsky, 1978). Obviamente, esto genera una gran diversidad de hábitats que conjuntamente con condiciones geológicas y edáficas diversas, resultan en un complicado mosaico climático. Todos estos factores determinan que en México se encuentren una gran variedad de tipos de vegetación que incluye desde los desiertos hasta las selvas y de los bosques templados hasta la vegetación de páramo. Según este mismo autor, existen 9 tipos básicos de vegetación: Bosque tropical perennifolio, Bosque tropical subcaducifolio, Bosque tropical caducifolio, Bosque espinoso, Pastizal, Matorral xerófilo, Bosque de coníferas y de *Quercus*, Bosque mesófilo de montaña y Vegetación acuática y subacuática. En ellos, se encuentran un total de 20,000 especies de plantas vasculares, lo cual equivale a la flora de Estados Unidos y Canadá juntos (Rzedowsky, 1978).

Se ha estimado que existen 263 géneros endémicos a México, agrupados en 62 familias, lo cual corresponde al 14% de endemismo a nivel genérico. La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) ha registrado 2870 especies de plantas vasculares endémicas al país, correspondiendo al 14% del total. El número de endemismos a nivel de género es más acentuado en zonas áridas y semiáridas, donde alcanza el 43 y 28%, respectivamente. En cambio, en las zonas tropicales húmedas no se presenta un alto número de endemismos,

pero si hay una mayor riqueza de especies; según Carabias (1994), en estas regiones se han encontrado hasta 200 especies y 10,000 individuos en una hectárea.

Con respecto a la situación de esta diversidad biológica, la UICN ha estimado que hay aproximadamente 477 spp. endémicas en México en peligro de extinción (Flores Villela y Geréz, 1988). Esta cifra significa que el 17% de las especies de plantas endémicas del país están amenazadas. Por otro lado, Vovides (1981), presenta una lista de especies en peligro de extinción agrupadas por Estados de la República Mexicana; obviamente, Estados como Chiapas, Oaxaca y Veracruz tienen más especies en peligro de extinción, dado que en ellos se encuentran la mayor parte de los sistemas más amenazados como son las selvas altas perennifolias. Según este mismo autor, 32 familias tienen especies en peligro de extinción, siendo las cactáceas las más amenazadas; lo más grave aquí, no es el número, sino la diversidad genética que está siendo afectada desde palmas y orquídeas hasta gramíneas.

Aproximadamente el 75% de la superficie del país está cubierta por vegetación natural en diferentes etapas de perturbación. De este, el 47% está en proceso de perturbación y el 53% restante está en condiciones relativamente íntegras. Así, en 1980 casi el 40% de territorio nacional estaba cubierto por vegetación relativamente íntegra (Gómez-Pompa y Dirzo, 1998).

Por otra parte, casi 25% del país está ocupado por sistemas productivos, es decir, por aquellos que son mantenidos directamente por las actividades humanas o bajo uso permanente como pastizal, agricultura de riego y temporal. Esta cifra debe analizarse en función de la topografía accidentada y de las zonas con alta probabilidad de desastres para la agricultura, condiciones que marcan los límites naturales para la expansión de la frontera agropecuaria, con aquellas áreas con potencial forestal productivo (Toledo, 1998).

Del 75% de la superficie del país cubierta por vegetación natural, casi la mitad está ocupada por matorral xerófilo, siguiendo en orden de importancia la selva baja caducifolia, el bosque de encino, el bosque de coníferas, los cuales juntos ocupan casi la otra mitad. El 14% restante, está cubierto por la selva alta perennifolia (la mitad), chaparral, selva tropical subcaducifolia y vegetación acuática. Debe mencionarse que la vegetación acuática, la selva alta perennifolia, la selva baja caducifolia, el bosque de coníferas y el bosque de encino están siendo objetos de rápidos cambios en el uso del suelo. Por otra parte, el matorral xerófilo y el chaparral presentan casi dos terceras partes de su cobertura perturbada (Flores Villela y Geréz, 1988).

Debe, asimismo, ponderarse la necesidad de contar con la tecnología y recursos necesarios para establecer bancos de germoplasma e impulsar programas de investigación relacionados con el cultivo de tejidos, así como también aquellos en los cuales se estudian los patrones de diversidad en las comunidades naturales. Esta urgente necesidad que implica una fuerte erogación presupuestal, ha llevado a que se considere a la conservación *in situ* como una forma muy adecuada para llevar a cabo la conservación genética de México (Carabias, 1994).

La conservación de la diversidad vegetal, debe hacerse en primer lugar entendiendo y en segundo lugar respetando las leyes y procesos naturales. Son cuatro los factores que explican la diversidad, los cuales deben ser abordados en una amplia gama de proyectos de investigación, así como buscarse su adecuada integración con políticas de desarrollo académico acordes a la realidad de las instituciones de investigación (Begon y Mortimer, 1986):

1. Los geográficos, como la altitud y latitud, los cuales no son por si mismos agentes causales de la diversidad.
2. Aquellos factores que permiten establecer relaciones con dichos gradientes, como la productividad y la variabilidad climática.

3. Factores que varían geográficamente, pero no de una manera consistente y que permiten establecer relaciones con la riqueza, como son la perturbación, el aislamiento de un hábitat, así como su heterogeneidad físico-química.

4. Finalmente, aquellos atributos biológicos de las comunidades que tienen influencia en su estructura: predación, competencia, heterogeneidad espacial y arquitectural generada por los individuos y el estado sucesional de la comunidad.

La conservación de la diversidad puede utilizarse adecuadamente compaginada con el desarrollo de un país que, como el nuestro, está en vías de desarrollo y con una necesidad de proveer los satisfactores básicos a una mayoría marginada socialmente. Esta planeación del manejo de la diversidad y por lo tanto de los recursos naturales, va desde no usar los que están en peligro de extinción, hasta utilizar otros que no están incorporados todavía en el proceso de producción (Carabias, 1994).

Por lo tanto, la planeación debe hacerse desde el nivel regional hasta nacional, hasta intra- e intersectorial. Así, para la Sociedad Botánica de México, debe hacerse más eficiente los mecanismos que permitan la participación y colaboración de todos los estudios de la diversidad desde cualquiera que sea su ámbito de investigación, con el fin de completar el esquema de entendimiento de quienes son, donde están, como se comportan, cómo se utilizan y cómo pueden conservarse las especies que integra la diversidad biológica del país (Gómez-Pompa y Dirzo, 1998).

Varios científicos han tratado de estimar el posible número de extinciones de especies que podrían ocurrir si el proceso de transformación masiva continúa. Algunas cifras son quizás exageradas, sin embargo el proceso de extinción es una realidad. Si se pierden 1, 10 o mil especies por año no es importante, lo importante es que se puedan estar extinguiendo por acciones humanas que podrían ser detenidas. La falta de información biológica sobre la presencia de especies en el campo a través del tiempo impide confirmar o rechazar estas

estimaciones. Es muy lamentable la escasez de nuevos proyectos taxonómicos y florísticos, ya que ellos son la fuente más creíble y actualizada sobre extinciones locales. Es también desalentador ver la lentitud del avance de los proyectos que se encuentran en marcha (Heywood *et al.*, 1994).

Esto lleva a considerar que la conservación debe ser entendida en su contexto más amplio y tomarse como una actividad que implica la utilización racional y sostenida de los recursos vegetales a largo plazo (Caballero, 1990).

### **2.1.1. Cuantificación de la variación genética**

La cuantificación de la variabilidad genética de una especie que se desea conservar, es primordial como apoyo a las estrategias de muestreo para promover la conservación genética. Una aplicación potencialmente útil es la cuantificación de parámetros no solo genéticos sino también los fenotípicos, los cuales ayudan a identificar caracteres genéticos tales como el vigor y la forma del fuste, ya que la variación causada por el ambiente puede, con frecuencia, inducir a errores de selección (es decir, no está claro si tales caracteres se deben a causas genéticas o a factores ambientales). Se han utilizado marcadores para comparar la variación dentro de una población y entre poblaciones de diversas especies de árboles (Daniell, 2002).

Los estudios cuantitativos de variación genética ofrecen la posibilidad de realizar una selección temprana y eficaz de principales características de crecimiento y desarrollo de las especies a conservar, procesos que deben realizarse previamente o en conjunto con técnicas de conservación, para establecer que individuos o que población son los más idóneos para la conservación.

### **2.1.2. Conservación de especies o poblaciones amenazadas**

En los últimos años, la protección de la diversidad genética se ha establecido como un objetivo prioritario en los planes de conservación mundial. Se trata, a largo plazo, de mantener la viabilidad evolutiva de las especies y para ello maximizar las posibilidades de supervivencia en un entorno cambiante. Por ello son de gran interés los estudios que evalúan poblaciones naturales para detectar variantes genéticas únicas y/o centros de variabilidad genética para conservar especies amenazadas, diseñando actividades de conservación *in situ* y *ex situ*, y para proteger la integridad de reservas genéticas nativas.

En este último caso, se deben establecer reservas naturales que pudieran tener variantes genéticas únicas como consecuencia de un flujo de genes reducido (aislamiento), pequeños tamaños de población y regímenes particulares de selección natural que ocasionará una diferenciación de otras poblaciones. Tal es el caso de *Caesalpinia echinata*, una especie sobreexplotada en Brasil, que se considera amenazada en la costa atlántica; el estudio de pequeñas poblaciones naturales mediante RAPDs ha permitido determinar claras correlaciones entre distancias genéticas y geográficas, identificando áreas de diversidad necesarias para diseñar planes de conservación (Cardoso *et al.*, 1998).

## **2.2. PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN**

### **2.2.1. Propagación por semilla**

Uno de los problemas primordiales en la calidad de las semillas es el deterioro, el cual es un proceso irreversible (Anderson, 1973), que demerita la calidad fisiológica al presentar un porcentaje bajo de germinación (Abdul-Baki y Anderson, 1972; Miranda, 1984), principalmente en aquellas que no tienen un manejo adecuado de postcosecha, lo cual ocasiona que se tenga poca

emergencia y por consecuencia un bajo establecimiento de plántulas en campo, generando así una reducción en los rendimientos por unidad de superficie.

Una alternativa en el empleo de semilla con deterioro incipiente es el uso de productos hormonales para hacer más eficiente el potencial fisiológico de la semilla y así evitar los problemas mencionados anteriormente, en donde los fitorreguladores sintéticos aplicados a semillas han sido utilizados principalmente para romper la latencia de algunas especies (Weaver, 1996), así como activar y/o acelerar el proceso de germinación de las mismas (Bidwell, 1996), estos productos son una buena alternativa para promover la germinación de la semilla (Agwah *et al.*, 1994) en virtud de que se han tenido problemas en la germinación oportuna debido a diversos factores ambientales, de nutrición y de sustancias orgánicas presentes en bajas cantidades.

Dentro de las hormonas utilizadas se encuentran las giberelinas, citocininas y auxinas. Las giberelinas se pueden definir como un compuesto que estimula el proceso de la germinación, las auxinas promueven la elongación celular y la formación de raíces. Por su parte las citocininas promueven la inducción de brotes (Sparks, 2000).

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

Este último punto es muy importante para la propagación de orquídeas, helechos, cactáceas y sobre todo de plantas leñosas como frutales y forestales. En muchos de los casos, el método de siembra *in vitro* elimina la inhibición de germinación de las semillas.

### 2.2.2. La biotecnología en la conservación

En México existen bancos de germoplasma importantes de cereales (CIMMYT) y leguminosas (INIA), pero carece de bancos que almacenen el invaluable potencial genético de las regiones tropicales tan seriamente amenazadas por deforestación como las maderables, frutales, plantas medicinales y forrajeras entre otras (Salgado-Garciglia *et al.*, 1997).

Realmente, los bancos de germoplasma se utilizan solo como una rutina para conservar el germoplasma de plantas como plátano (*Musa spp.*) y papa (*Solanum tuberosum*), ya que da la posibilidad de mantener tejidos somáticos por largos períodos sin problemas de contaminación (Villalobos y Engelmann, 1995).

De ahí la importancia de la conservación de germoplasma y propagación masiva de especies vegetales amenazadas, con gran importancia para industrias como la farmacéutica, textil y maderera (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

Una técnica para conservar una especie vegetal es el establecimiento *in vitro* de colecciones bajo condiciones de crecimiento normales o limitadas, técnica conocida como cultivos de tejidos vegetales *in vitro*, con la cual se obtiene la propagación clonal rápida de un gran número de plántulas en un período breve (micropropagación), así como la conservación de germoplasma bajo condiciones controladas, en espacios pequeños y con poca mano de obra, además de la garantía de sanidad y estabilidad genética, lo que facilita enormemente el intercambio internacional de germoplasma (Villalobos, 1990).

La biotecnología con sus diferentes aplicaciones, es una herramienta que permite el manejo de los sistemas biológicos para el beneficio de la humanidad e incluye los métodos convencionales de fitogenética y cultivo de tejidos vegetales. La nueva biotecnología ofrece una serie impresionante de técnicas para superar

las limitaciones biológicas convencionales debidas a las grandes dimensiones de los árboles y a los procesos sexuales retardados, comunes a las especies leñosas. Éstas incluyen: cultivo de células y micropropagación, selección genotípica *in vitro*, conservación *in vitro* y un gran número de tecnologías en el campo de la genética molecular (Becwar *et al.*, 1988).

Con el cultivo de tejidos vegetales, utilizando partes aisladas de la planta (semillas, embriones, hojas, tallos, raíces, flores, frutos, anteras, microsporas, células, protoplastos, etc.), se puede obtener la clonación de árboles de importancia forestal con el fin de obtener su mejoramiento genético, propagación masiva o simplemente recuperarlo si éste se encuentra dentro de alguna categoría de extinción.

La germinación *in vitro* tiene ventajas respecto a la producida en condiciones naturales: puede solucionar casos de inhibición total de la germinación, permitir la germinación de semillas con intermediario obligado, aumentar la tasa de germinación, evitar el aborto embrionario, reducir el tiempo necesario y sincronizar la germinación.

La multiplicación por semilla constituye el método más frecuente de propagación. Sin embargo, el estado de dormición presente en muchas semillas de especies silvestres reduce significativamente su eficacia. Cuando no resulta posible la propagación por semilla o interesa propagar un determinado genotipo, se recurre a las técnicas convencionales de propagación vegetativa o a la micropropagación. Las técnicas de micropropagación resultan atractivas debido a las altas tasas de multiplicación que se consiguen y al reducido material de partida requerido. No obstante, presenta dificultades a la hora de reproducir la diversidad genética almacenada y mantener su integridad genética.

### **2.2.3. Micropropagación de especies arbóreas**

La biotecnología es una herramienta que se puede emplear para la conservación y propagación *in vitro* de especies catalogadas en alguna categoría de riesgo de extinción, bien sea mediante el establecimiento *in vitro* de algún segmento de la planta (asexual) o a partir de la siembra de semilla (sexual), para lo cual se requiere establecer cultivos *in vitro*, un sistema de regeneración de una planta completa a través de embriogénesis somática o por el sistema de organogénesis que permita la multiplicación, el enraizamiento y la aclimatación de los genotipos seleccionados. Con el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se proporcionan ventajas de calidad sanitaria en la producción de plantas, puede disminuirse el tiempo para propagar una especie importante y se garantiza la similitud genética del material parental, por la reproducción clonal. Además se ofrece este procedimiento en el mejoramiento genético y en la preservación de germoplasma (Villalobos, 1990).

Una de las aplicaciones de mayor repercusión mundial ha sido la propagación masiva de plantas a través de la micropropagación, proporcionando las bases para el establecimiento de bancos de germoplasma, los cuales constituyen un excelente recurso para concretar la idea de un desarrollo sustentable, donde se plantea mantener la estabilidad de las condiciones físicas de un área, preservar la biodiversidad, reducir la degradación ambiental y mantener la productividad agrícola (Villalobos y Engelman, 1995).

La mayoría de los estudios realizados sobre micropropagación se han llevado a cabo en más de 50, 000 variedades de más de 1, 000 especies de plantas ornamentales, agrícolas, forestales y en especies de uso industrial. Sin embargo, el uso de esta tecnología en especies nativas de diversos ecosistemas, sobre todo de especies arbóreas o leñosas, ha resultado un proceso complejo en muchas especies que han sido estudiadas (Pérez-Ponce, 1998).

Se puede resaltar su importancia en el área agroforestal, donde destaca la micropropagación de especies arbóreas, ya que permite eliminar los problemas relativos a la duración de los ciclos de desarrollo que comprenden desde la siembra de la semilla hasta la floración, lo cual ha hecho difícil la aplicación de programas de mejoramiento convencional para estas especies. La aplicación de técnicas de cultivos de tejidos en coníferas y otras especies leñosas, ofrece una alternativa valiosa para la propagación clonal de árboles elite (con características importantes de crecimiento y desarrollo), así como un modelo experimental para estudios morfogénicos fisiológicos y bioquímicos (Pérez-Ponce, 1998).

Los métodos tradicionales de propagación en coníferas y otras especies leñosas se han basado principalmente en la siembra de estacas, fascículos enraizados e injertos. Sin embargo, existen muchas especies en las cuales la producción de estacas enraizadas es muy difícil, debido a una serie de problemas que varían entre especies y aún entre árboles. Generalmente, se ha señalado que la capacidad y velocidad de enraizamiento y la longitud de las raíces, disminuye a la par que aumenta la edad del árbol donador. Sin embargo, en algunas especies esta característica no es tan pronunciada, mientras que en otras aún en estado juvenil muestran una baja eficiencia en el proceso de enraizamiento (Orea y Villalobos, 1990).

Diversos estudios sobre micropropagación se han llevado a cabo en especies arbóreas cuya tecnología es ampliamente conocida y son sembrados en extensas áreas. Por el contrario, con relación a las especies nativas de tipo arbóreo, algunas técnicas de mejoramiento tienen posibilidades limitadas, por las complicaciones que se derivan de características inherentes a los árboles, tales como ciclos de vida largos, fases pronunciadas de juvenilidad y madurez, poca frecuencia de individuos, etc. (Trujillo y García, 1998).

Aunque son pocas las especies reportadas con óptimos sistemas de micropropagación, ya se propagan por esta vía especies de *Pinus*, *Thuja*,

*Quercus*, *Picea*, *Abies*, *Sequoia*, *Pawlonia*, *Ulmus*, *Eucalyptus*, entre otras, ya sea por medio de la regeneración de brotes (organogénesis) o por la formación de embriones somáticos (embriogénesis somática).

Con base en la problemática de indeterminación de un protocolo común para el establecimiento y regeneración *in vitro* para todas las plantas, debido a que los tejidos difieren en su capacidad de respuesta, es necesario continuar con investigaciones en diversas plantas, sobre todo en aquellas donde no se han encontrado las condiciones óptimas del cultivo para lograr procesos de organogénesis o embriogénesis somática *in vitro* y así ofrecer un conocimiento más amplio que lleve a determinar qué o cuáles factores son determinantes en la regeneración de plantas *in vitro*.

Tal es el caso de *Tilia americana* var. *mexicana*, que presenta la necesidad de rescate de germoplasma silvestre, y que con estas técnicas se pretende establecer sistemas *in vitro*, lo que permitiría la conservación *in vitro* y a mediano plazo su propagación (sexual y clonal).

#### **2.2.4. Conservación *in vitro***

Una alternativa a las colecciones de campo es el establecimiento *in vitro* de colecciones bajo condiciones de crecimiento normales o limitadas. El cultivo de tejidos permite la propagación clonal rápida de un gran número de plántulas en un período breve, y la conservación de germoplasma, bajo condiciones controladas, en espacios pequeños y con poca mano de obra, además de la garantía de sanidad y estabilidad genética, lo que facilita enormemente el intercambio internacional de germoplasma (Banerjee y De Langhe, 1983; Winthers, 1984).

La conservación *in vitro* puede ser dividida en tres categorías: a corto, mediano y largo plazo (López *et al.*, 1985). En la conservación a corto y mediano plazo, se

reduce el crecimiento del segmento vegetal (explante) por alguna de las siguientes técnicas del cultivo *in vitro*:

- 1.- Reducción del espacio de crecimiento.
- 2.- Inducción de estrés osmótico por medio de la adición de sustancias como manitol, sorbitol, o sacarosa.
- 3.- Proporción de la fuente de carbono a niveles sub o sobre los óptimos.
- 4.- Mantenimiento de los cultivos a temperaturas y luz reducidas.
- 5.- Empleo de inhibidores de crecimiento en el medio de cultivo.

La conservación a largo plazo implica el almacenamiento de células, tejidos u órganos vegetales en temperaturas ultra bajas (-196°C, nitrógeno líquido), donde los procesos de desecación y el uso de sustancias crioprotectoras como glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), polietilenglicol (PEG) son indispensables para mantener altos porcentajes de viabilidad (Villalobos *et al.*, 1990).

En la mayor parte de los procedimientos empleados actualmente, no se hace referencia al control efectivo del desarrollo de las plantas *in vitro*. Sin embargo (Kozai *et al.*, 1992; Buddenford-Joosten y Woltering, 1994) mencionan que las tasas de crecimiento, desarrollo y varias de las características fisiológicas y morfológicas de las plantas formadas *in vitro* están influenciadas por el ambiente físico, químico y gaseoso de los recipientes.

El ambiente *in vitro* presenta tasas bajas de flujo de energía, debido a la existencia de un ambiente semicerrado, con mínimas variaciones de temperatura, elevada humedad relativa y grandes cambios diarios de la concentración de CO<sub>2</sub>, en el interior de los recipientes (Cañal *et al.*, 1999), la temperatura a la que se expone el explante cultivado *in vitro* afecta a la mayoría de los procesos fisiológicos.

Los requerimientos para la conservación *in vitro* son similares a los que se precisan para la propagación vegetativa, como es el de mantener la estabilidad genética, esto es lo que ocurre generalmente en el cultivo *in vitro* de meristemas, pices y embriones; se debe garantizar la ausencia de enfermedades; no se debe perder el potencial de regeneración, debe existir una baja probabilidad de daño o muerte del material (Pierik, 1990).

El germoplasma que se conserva bajo cualquiera de las técnicas de conservación *in vitro* debe ser recuperable fácilmente, manteniendo las características del material original; para lograrlo, los tejidos meristemáticos son los más adecuados para ser usados como explantes, a diferencia de los callos o células en suspensión, dado que los primeros ofrecen una menor probabilidad de variación genética (Grout y Henshaw, 1980).

### **2.3. GENERALIDADES DE *Tilia***

La familia Tiliaceae fue establecida en 1789 por A. L. De Jussieu con base en el género *Tilia*, esta familia se distribuye ampliamente a nivel mundial y las flores de sus diferentes especies se han empleado en la herbolaria de varios países como sedante, antiespasmódico, diaforético, emoliente, anticatarral, diurético, antirreumático (Volák y Stodola, 1990; Wichtl, 2004).

La familia incluye aproximadamente 50 géneros y 450 especies, con distribución principalmente pantropical y ocasionalmente templada (Cronquist, 1981). De acuerdo con Heywood (1985), presenta una amplia distribución en todas las regiones tropicales del mundo, especialmente en América del Sur, África y Sur de Asia. En México la familia Tiliaceae está representada por 12 géneros, de los cuales uno es introducido (*Sparmania*). Cuenta con aproximadamente 63 especies, las cuales forman parte de la flora de los diferentes ecosistemas cálidos y templados del país (Colmenero-Robles *et al.*, 2003).

### **2.3.1. *Tilia americana* var. *mexicana* (Schltdl.) Hardin**

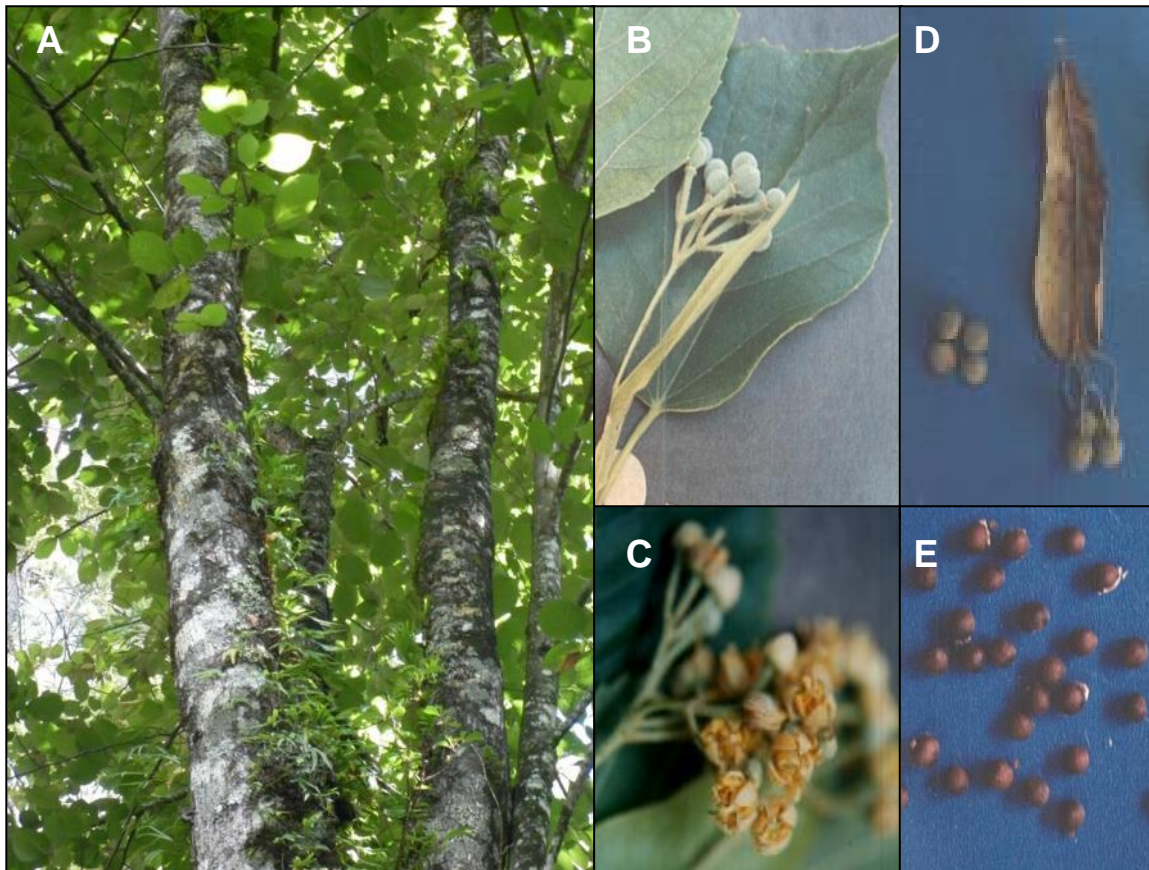
*Tilia americana* var. *mexicana* es una especie que pertenece a la familia Tiliaceae, de la división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida y orden Malvales (según clasificación de Brands (2008) (Cuadro 1). son árboles de 5 a 22 metros de alto (Figura 1A), con tallos estrellado-pubescente, glabrescentes. Hojas con láminas demediadas, de 6 a 25 cm de largo, 3.5 a 15.0 cm de ancho, haz glabro o estrellado-pubescente, envés densamente estrellado-pubescente (Figura 1B). Inflorescencia de 8 a 17 cm de largo, densamente estrellado-pubescente; pedicelos de 0.5 a 1.2 cm de largo, densamente estrellado-pubescente; flores de 0.65 a 1.8 cm de diámetro; sépalos de 0.4 a 8 cm de largo, 0.3 a 0.5 cm de ancho, haz con pelos simples y estrellados, envés cortamente estrellado-pubescente, margen entero, de 4 a 9 mm de largo, de 2 a 4 mm de ancho; estambres connatos formados de 10 a 15 fascículos (Figura 1C); estaminodios espatulados, ápice redondeado, de 3 a 6 mm de largo, 1.5 a 2.5 mm de ancho, intercalados entre 2 ó 3 fascículos; filamentos filiformes, de 2.5 a 5.0 mm de largo, bifurcados en el ápice, cada bifurcación portando una teca; ovario de 1.5 a 2.0 mm de largo y ancho, estilo rollizo, de 1.5 a 7.0 mm de largo. Nuez de 0.5 a 1.0 cm de largo y ancho (Figura 1D), semillas de 5 mm de largo, 3 a 4 mm de ancho, de color castaño oscuro (Figura 1E) (Watson y Dallwitz, 1992; Bello, 1993).

#### **2.3.1.1. Distribución de *Tilia americana* var. *mexicana***

Esta especie tiene varios nombres comunes de acuerdo a la región donde se encuentre la planta, Cirimo, Sirimo (P'urhépecha), Sirimu, Tila, Tilia, Tilia estrella, Tirimo, Tzirimo y Tzirimu en Michoacán y Jalisco); Yaca y Yaco en Oaxaca (Martínez, 1987). Presenta sinonimia con *Tilia mexicana* Schltdl. Este árbol está catalogado como en peligro de extinción por la Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-2010 (SEMARNAT, 2010).

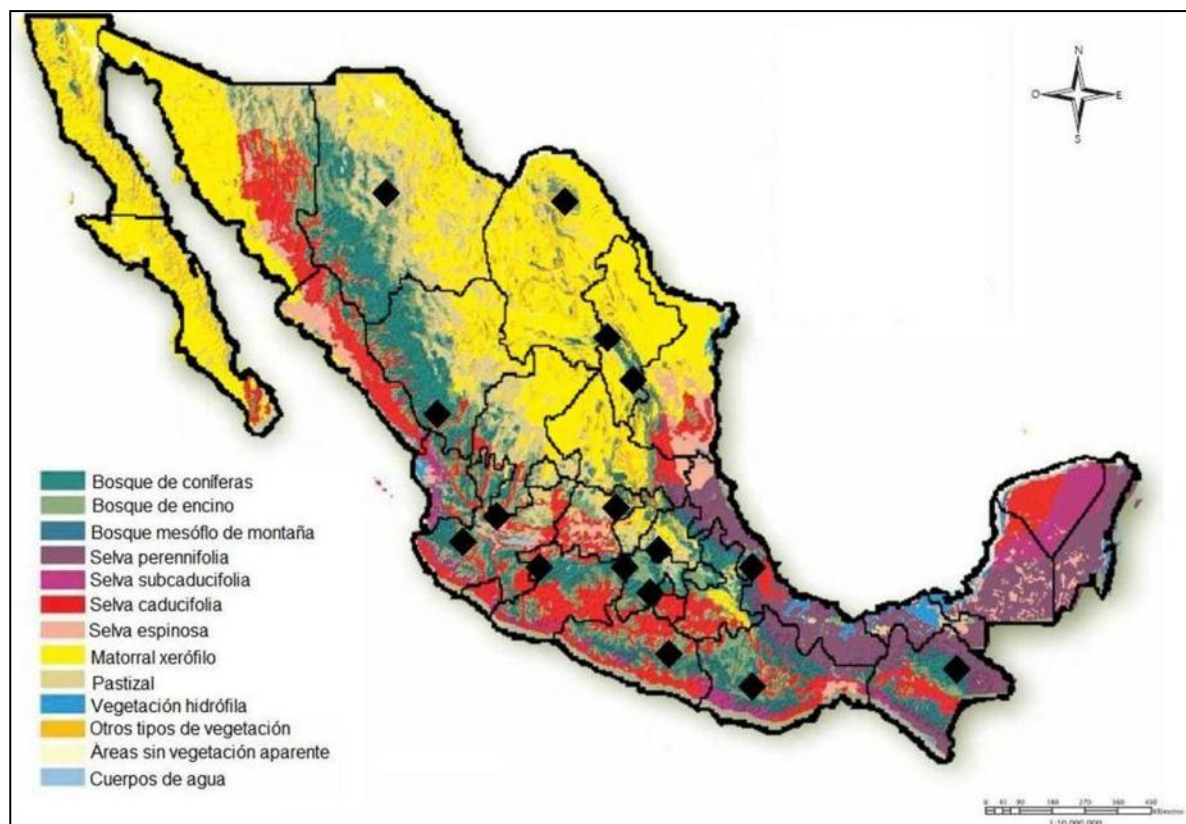
**Cuadro 1.** Clasificación botánica de *Tilia americana* var. mexicana (Brands, 2008).

Dominio	<b><i>Eukaryota</i></b>
Reino	<b><i>Plantae</i></b>
Subreino	<b><i>Viridaeplantae</i></b>
Phylum	<b><i>Tracheophyta</i></b>
Subphylum	<b><i>Euphyllophytina</i></b>
Infraphylum	<b><i>Radiatopses</i></b>
Clase	<b><i>Magnoliopsida</i></b>
Subclase	<b><i>Dilleniidae</i></b>
Superorden	<b><i>Malvanae</i></b>
Orden	<b><i>Malvales</i></b>
Familia	<b><i>Tiliaceae</i></b>
Subfamilia	<b><i>Tilioideae</i></b>
Tribu	<b><i>Tilieae</i></b>
Género	<b><i>Tilia</i></b>
Especie	<b><i>Tilia americana</i></b>
Variedad	<b><i>mexicana</i></b>



**Figura 1.** *Árbol de Tilia americana* var. mexicana (Schltdl.) Hardin (A) y algunas partes características: Hoja (B), Flores (C), Frutos (D) y Semillas (E).

En México, se distribuye en varios Estados como Chihuahua, Colima, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz. En la Figura 2 se muestra un mapa de la distribución de esta especie en la república mexicana. Se le encuentra desde los estados de Chihuahua y Coahuila en el norte del país hasta los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas. En Michoacán puede ubicarse en los siguientes municipios: Charo, Cherán, Chilchota, Coalcomán, Erongarícuaro, Morelia, Nahuatzen, Nuevo Parangaricutiro, Paracho, Pátzcuaro, Queréndaro, Los Reyes, Salvador Escalante, Tingambato, Uruapan y Zacapu (Bello, 1993).



**Figura 2.** Distribución natural a nivel nacional de *Tilia americana* var. *mexicana* (Pavón y Rico-Gray, 2000).

A *Tilia americana* var. *mexicana* se le encuentra generalmente en bosques templados o bosque mesófilo de montaña, asociado a *Abies*, *Quercus*, *Pinus-Quercus*. Crece en bosques de encino y bosque de pino, entre los 1300 y los 2400 msnm. Crece sobre diversos tipos de suelos, en los que se incluyen los andosoles y litosoles. A pesar de su distribución en bosques de pino y encino, es común asociar esta especie con la vegetación de selva tropical caducifolia y subcaducifolia (Soto, 1987).

### **2.3.1.2. Usos de *Tilia* en México**

Se han reportado varios usos de *Tilia* en la medicina tradicional, por un lado, se usa la parte aérea, principalmente para el tratamiento de trastornos nerviosos; la planta fresca es más activa para conciliar el sueño, en general es útil para calmar los estados de excitación nerviosa acompañada de insomnio, dolor de cabeza y malestar en general (Martínez, 1969; Martínez y Matuda; 1979, Bello, 1993). Otros usos de la infusión de flores de esta planta reportados son como: antiespasmódica y contra la tos (Martínez, 1969), para tratar la enterocolitis, gastroenteritis, hemorroides, cólicos hepáticos y nefríticos, dolores de la vejiga inflamada y el corazón (Pavón y Rico-Gray, 2000). En México se elaboran productos medicinales, específicos como sedante y espasmolítico (Nervinae© y Tilamex©) (Rojas-Alba, 1996).

En Michoacán, el cirimo es una de las especies más apreciadas por los artesanos, sobre todo por los guitarreros, fabricantes de máscaras y de figuras y utensilios tallados a mano. Desgraciadamente en la actualidad es muy difícil de conseguir, por lo que muchos de los artículos que hacían exclusivamente de cirimo los están haciendo de pino, principalmente pino lacio (*P. michoacana* var. *cornuta*) (Guridi, 1980). Esta especie está reportada como fuente de madera para la elaboración de artesanías en Inventario de especies vegetales y animales de uso artesanal realizado por CONABIO en el 2000 (Bravo-Marentes y López-Gómez, 1999).

En Zirahuén consideran esta madera insustituible para la fabricación de cucharas, tenedores y palas talladas a mano, sobre todo por ser ligera, blanda y fácil de trabajar. En Uruapan la utilizan para hacer fruta tallada y decorada al maque, cuando la consiguen. También la utilizan para hacer máscaras y era muy usada en la fabricación de bateas y cajas. En Cherán hacen también máscaras. En Paracho la utilizan para la tapa de la guitarra popular tipo español y es muy apreciada por artesanos, pues no se dobla ni se raja, siendo además más económica que el pino canadiense (Guridi, 1980).

La tilia se aprovecha generalmente en fresco, para lo cual se cortan las ramas delgadas y se pican incluyendo a las flores y hojas. Su aprovechamiento se rige por la NOM-007-RECNAT-1997, que establece los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento de ramas, hojas, flores, frutos y semillas. Se comercializa tanto a granel como procesado, este último concepto incluye la elaboración de productos picados, secados molidos, encapsulados y envasados, se vende tanto en puestos ambulantes, como mercados públicos.

### **2.3.1.3. Situación ecológica**

Por los usos medicinales y sobreexplotación, aunado a que el hábitat de *T. mexicana* se ha reducido de manera alarmante debido al cambio de uso del suelo y el crecimiento desmedido de las zonas urbanas. Los árboles muchas veces son derribados completamente para obtener las flores y las brácteas que se comercializan para la elaboración de infusiones con actividad antidepresiva, frustrando el desarrollo de frutos y semillas, limitando así la propagación sexual impidiendo el crecimiento y la regeneración de poblaciones naturales. Por otro lado, esta especie tiene problemas para su propagación por vía sexual ya que sus semillas cuentan con dos tipos de latencia, una latencia exógena donde la testa es impermeable al agua e impide el intercambio gaseoso con el medio exterior, y una latencia endógena donde el embrión es inmaduro (Santiago, 1998).

García-Magaña (1994) reporta la dificultad de propagación tanto sexual (semillas) como vegetativa (estacas) del cirimo, por lo que actualmente no existe un método eficiente para su propagación masiva por semilla. Atrián (2005) reportó la multiplicación de brotes y el enraizado de éstos bajo condiciones de cultivo *in vitro*, con éxito en la germinación de semillas y más recientemente se ha reportado la propagación por estacas de árboles adultos (Flores-Muñoz *et al.*, 2011).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Es necesario desarrollar estudios en plantas de cirimo para evaluar su crecimiento y desarrollo en etapas tempranas para lograr su propagación y cultivo en invernadero.

Los sistemas de propagación tanto en invernadero como en cultivos *in vitro*, mediante la germinación o propagación clonal (micropropagación) son una alternativa para llevar a cabo este tipo de estudio.

El conocimiento generado con estas metodologías, ofrece el rescate y conservación del germoplasma silvestre de esta especie, pudiéndose asegurar el cultivo en plantaciones o bien programas de repoblación.

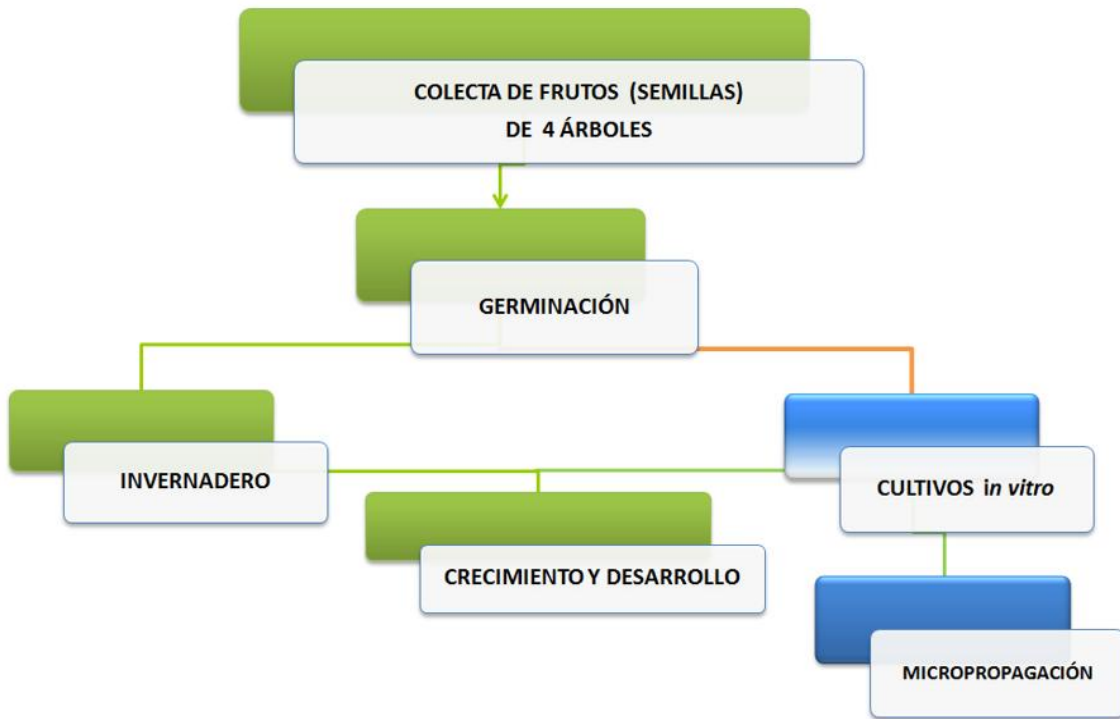
#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el crecimiento y desarrollo de plantas de *Tilia americana* var. *mexicana* (SCHTCL.) HARDIN propagadas *in vitro* e invernadero, para lograr su conservación.

##### **3.1. Objetivos particulares**

1. Determinar las condiciones óptimas de germinación de semillas *Tilia americana* var. *mexicana* bajo cultivo *in vitro* e invernadero.
2. Comparar el desarrollo inicial de plantas de cirimo (*Tilia americana* var. *mexicana*) bajo cultivo *in vitro* e invernadero.
3. Establecer los sistemas de micropropagación del cirimo (*Tilia americana* var. *mexicana*) (TILIACEAE) por cultivo de yemas axilares.

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 6. RESULTADOS

### CAPÍTULO I

#### **CARACTERÍSTICAS DE SITIOS DE COLECTA DE SEMILLAS DE *Tilia americana* var. *mexicana*, EN EL ESTADO DE MICHOACÁN, MÉXICO.**

##### **Características y ubicación geográfica de sitios de colecta**

###### Sitio 1. Ichaqueo

Ichaqueo es una pequeña comunidad que pertenece al municipio de Morelia, Michoacán, el cual se ubica entre los paralelos 19°52' y 19°26' de latitud norte; los meridianos 101°02' y 101°31' de longitud oeste; y presenta una altitud entre 1 500 y 3 000 m. Colinda al norte con los municipios de Huaniqueo, Chucándiro, Copándaro y Tarímbaro; al este con los municipios de Tarímbaro, Charo, Tzitzio y Madero; al sur con los municipios de Madero, Acuitzio, Pátzcuaro y Huiramba; al oeste con los municipios de Huiramba, Lagunillas, Tzintzuntzan, Quiroga, Coeneo y Huaniqueo. Ocupa el 2.04% de la superficie del estado (INEGI, 2005).

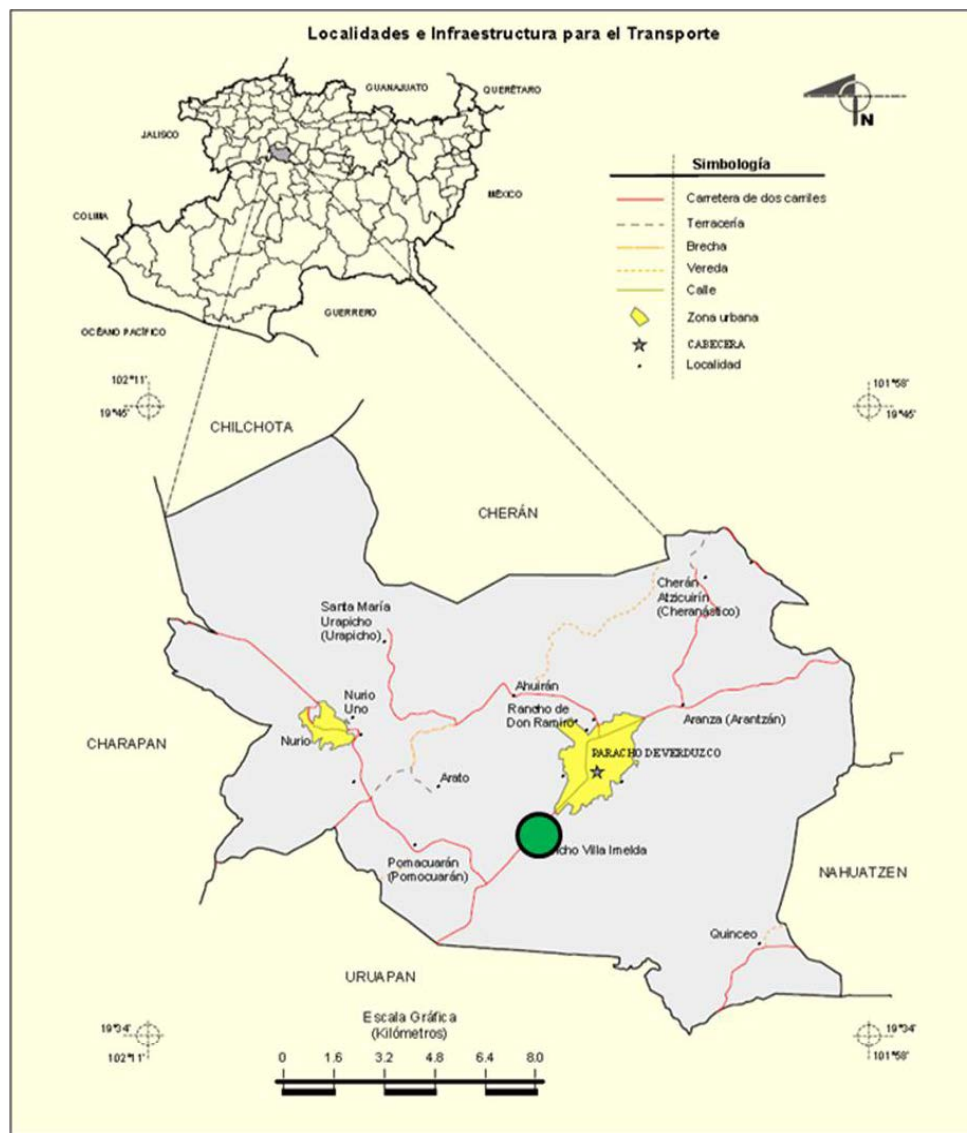
*Sitio de Colecta.* Comunidad de Ichaqueo (19° 34' 00" N, 101° 08' 45" O), se ubica a 17 km al sur de Morelia, capital del estado de Michoacán, México (Figura 5). Tiene una altitud de 2300 msnm. Los árboles de *Tilia mexicana* son muy escasos en esta área, el bosque comprende una inmensa superficie, llena de ríos y cascadas, donde predominan el pino y encino y habitan muchas especies de animales y plantas, algunas de ellas endémicas (Figura 1).

En este sitio de colecta se reporta un clima C(W2) o templado subhúmedo con lluvias en verano de mayor humedad. Los rangos de temperatura se ubican entre 16°C y 18°C y la precipitación puede llegar a los 1,200 mm anuales. El tipo de suelo predominante es luvisol (INEGI, 2005; Clave geoestadística 16053, 2009).



el 0.42% de la superficie del estado (INEGI, 2005; Clave geoestadística 16065, 2009) (Figura2).

*Sitio de Colecta.* Se ubica a 18 km al suroeste de la comunidad de Paracho de Verduzco, a una altitud de 2300 msnm (19° 35' 41.09" N, 102° 04' 13.13" O), donde predomina bosque de encino y bosque de pino-encino (INEGI, 2005) (Figura 2).



**Figura 2.** Ubicación geográfica del Municipio de Paracho y sitio de colecta (●) de *Tilia americana* var. *mexicana* (INEGI, 2005; Clave geoestadística 16065, 2009).

Para este sitio se reporta un clima C(W2) o templado subhúmedo con lluvias en verano. Los rangos de temperatura se ubican entre 12°C y 18°C y la precipitación puede llegar a los 1,200 mm anuales. El tipo de suelo predominante es andosol (INEGI, 2005; Clave geoestadística 16053, 2009).

### Sitio 3. Tancítaro

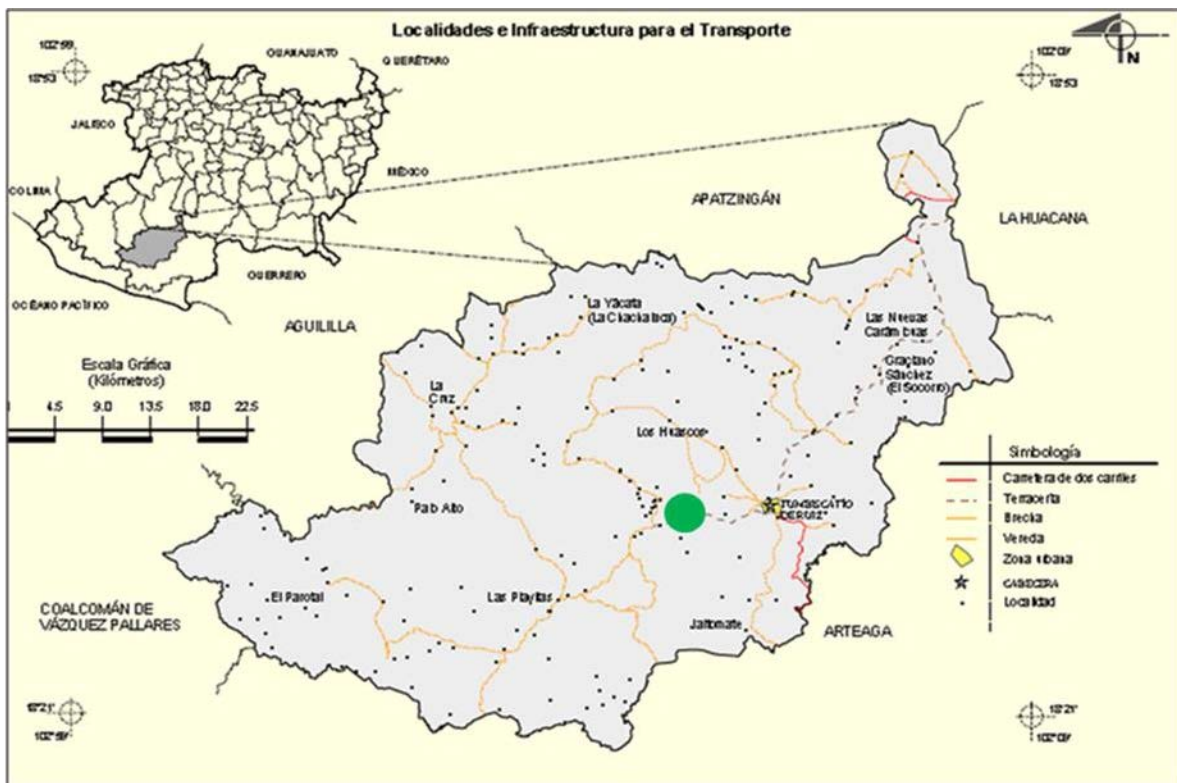
El Área de Protección de Flora y Fauna Pico de Tancítaro se localiza en la región suroeste de la República Mexicana, al centro-oeste del estado de Michoacán de Ocampo, dentro de los Municipios de Tancítaro, Peribán de Ramos, Uruapan y Nuevo San Juan Parangaricutiro. El Pico de Tancítaro y sus alrededores, se encuentran circunscritos a la Provincia Fisiográfica del Eje Neovolcánico, en la subprovincia Neovolcánica Tarasca y cerca del límite con la subprovincia Escarpa Limítrofe del sur, en la zona llamada Cinturón Volcánico Mexicano (INEGI, 2005). De acuerdo con el mapa oficial de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (2008), el Área de Protección de Flora y Fauna cuenta con una superficie de 23,405,096.55 hectáreas, sus coordenadas extremas son 19°31'10.50"– 19°20'21.23" Latitud Norte y 102°12'41.61" - 102°24'11.81" Longitud Oeste (CONANP, 2008) (Figura 3).

*Sitio de Coleta.* Se localiza en un área de cañadas cerca de la Comunidad El Rosario, a una altitud de 2,160 msnm (19° 24' 21" N, 102° 10' 17.19" O), pertenece a bosque mesófilo de montaña clasificado como un bosque mesófilo abierto, en donde hay un número bajo de individuos de *Tilia mexicana*. Se observan, entre otras especies arbóreas, a *Trema micrantha*, *Quercus candicans*, *Alnus acuminata* ssp. *glabrata*, *Carpinus caroliniana*, *Saurauia serrata*, *Oreopanax echinops* y *Hedyosmum mexicanum*, con abundantes arbustos como *Rapanea juergensenii*, *Parathesis* spp., *Salvia albo-caerulea*, *Fuchsia arborescens*, *Malvaviscus arboreus*, *Phymosia rosea*, *Dendropanax arboreus*, y algunas trepadoras como *Ipomoea funis*, *Vitis bourgaeana* y *Passiflora* spp (CONANP, 2008) (Figura 3).



*Sitio de Coleta.* Se localiza a 32 km hacia el noroeste de la Ciudad de Tumbiscatío de Ruíz en un área de montaña, a una altitud de 1,800 msnm (18° 26' 24.60" N, 102° 30' 26.54" O), predominante bosque pino-encino y bosque de encino con buen número de individuos de *Tilia mexicana* (INEGI, 2005; Clave geoestadística 16096, 2009) (Figura 4).

En esta área se reporta un clima C(W2) o templado subhúmedo con lluvias en verano. Los rangos de temperatura se ubican entre 18°C y 20°C y la precipitación puede llegar a los 1,200 mm anuales. El tipo de suelo predominante es luvisol (INEGI, 2005).



**Figura 4.** Ubicación geográfica de Tumbiscatío y sitio de colecta (●) de *Tilia americana* var. *mexicana* (INEGI, 2005; Clave geoestadística 16096, 2009).

## Características de los árboles fuente de semilla colectada

En el cuadro 1 se describe la cantidad de árboles por sitio de colecta y las características de los que fueron al fuente de semillas. En la figura 5 se muestran fotografías de árboles de *Tilia americana* var. *mexicana* seleccionados para la colecta de semillas.

**Cuadro 1.** Número y características de los árboles de *Tilia americana* var. *mexicana* seleccionados para la colecta de semillas en los diferentes sitios de Michoacán, México.

Sitio de colecta	Número de árboles por sitio	Número de árboles colectados	Altura del árbol (m)	Circunferencia del tronco a la altura del pecho (cm)
Ichaqueo	3	1	13	87
Paracho	1	1	13.5	79
Tancítaro	1	1	12	89
Tumbiscatío	6	1	14	92



**Figura 5.** Árboles de *Tilia americana* var. *mexicana* fuente de semillas colectadas de cada sitio. A) Ichaqueo; B) Paracho; C) Tancítaro; D) Tumbiscatío.

## LITERATURA CITADA

CONANP, 2008. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Estudio previo justificativo para la recategorización del Parque Nacional Pico de Tancítaro como Área de Protección de Flora y Fauna. Michoacán, México. 132p.

Clave geoestadística 16053, 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Morelia, Michoacán de Ocampo, México. 9 p.

Clave geoestadística 16065, 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Paracho, Michoacán de Ocampo, México. 9 p.

Clave geoestadística 16083, 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Tancítaro, Michoacán de Ocampo, México. 9 p.

Clave geoestadística 16096, 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Tumbiscatío, Michoacán de Ocampo, México. 9p.

INEGI, 2005. Marco Geoestadístico Municipal, versión 3.1. [http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geoestadistica/M\\_Geoestadistico.aspx](http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geoestadistica/M_Geoestadistico.aspx)

## CAPÍTULO II

### GERMINACIÓN DEL CIRIMO (*Tilia americana* var. *mexicana*) (TILIACEAE) BAJO CULTIVO *IN VITRO* E INVERNADERO

#### RESUMEN

Para obtener los porcentajes de germinación en *Tilia americana* var. *mexicana* (cirimo), semillas de cuatro árboles, uno por cada sitio de colecta (Ichaqueo, Paracho, Tancítaro y Tumbiscatío) en Michoacán, México, fueron colectadas y cultivadas bajo condiciones de cultivo *in vitro* e invernadero, determinando los porcentajes cada 30 días. En invernadero se cultivaron 5 semillas por maceta, iniciado la germinación a los 90 días en semillas del Árbol 1 (Ichaqueo) y hasta los 120 días del cultivo en semillas de los otros tres árboles. A los 150 días de cultivo se obtuvieron porcentajes de germinación de 15.5%, 6%, 6% y 4% en semillas provenientes del Árbol 4 (Tumbiscatío), Árbol 1 (Ichaqueo), Árbol 2 (Paracho) y Árbol 3 (Tancítaro), respectivamente. Debido a que solo germinó una semilla por maceta, los cultivos *in vitro* fueron realizados con tres tratamientos de siembra, T1 (1 semilla/frasco), T2 (3 semillas/frasco) y T3 (5 semillas/frasco). En los cultivos *in vitro*, las semillas iniciaron el proceso de germinación a los 30 días de cultivo en porcentajes mayores a los observados en invernadero. Un 100% de germinación se obtuvo en semillas del tratamiento T1 de los Árboles 1 y 4 y un 60% del mismo tratamiento en semillas de los Árboles 2 y 3. Se presentan valores reales de germinación considerando el número de frutos colectados, número total de semillas y el de semillas sembradas, determinando el porcentaje de germinación más alto en las cultivadas *in vitro* del Árbol 1 (Ichaqueo) con un 32.2%, correspondiente al tratamiento T1. Los cultivos *in vitro* de una semilla/frasco de cirimo favorecen la germinación, independientemente del árbol o de sitio de colecta.

## INTRODUCCIÓN

*Tilia americana* var. *mexicana* (cirimo) es una especie con serios problemas de propagación sexual, los cuales han sido provocado en algunos de los casos, por la sobreexplotación de sus flores, ya que éstas presentan propiedades medicinales de gran interés para el hombre, que ayudan a combatir el insomnio y alteraciones nerviosas principalmente (Pavón y Rico-Gray, 2000). Además, la reducción de las poblaciones por múltiples usos que se le da a la especie, la han situado en la categoría de plantas en peligro de extinción (PE) en la Norma Oficial Mexicana de Ecología (NOM-059-ECOL-2010) (SEMARNAT, 2010).

En la actualidad, pocos son los estudios de germinación de semillas de cirimo y en general de sus sistemas de propagación. Entre estas investigaciones se encuentra la realizada por Atrián-Mendoza (2005), quien estableció un sistema de germinación *in vitro* de cirimo, obteniendo óptimos porcentajes de germinación (54%) al cultivar semillas de colecta reciente. García-Magaña (1994), reportó porcentajes de germinación menores del 50% al utilizar tratamientos pre-germinativos para la propagación en vivero, como el uso de ácidos y bajas temperaturas. En ambos estudios se puntualiza que semillas de un año o más de colecta disminuyen o pierden su viabilidad y que es necesario realizar tratamientos de escarificación para aumentar dichos porcentajes de germinación.

Los bajos porcentajes de las semillas de cirimo en forma natural se deben a las características físicas del fruto y la semilla, que impiden la germinación rápida y efectiva. El fruto presenta un pericarpio muy resistente, las semillas en su caso tienen una testa muy peculiar, ya que ésta genera un doble efecto; el primero de tipo químico, por la presencia de inhibidores fenólicos; el segundo de tipo mecánico, lo cual impide el flujo necesario de agua y oxígeno para la germinación (Rowe y Bazich, 2008). Bajo condiciones naturales, las semillas con cubiertas muy fuertes, como es el caso de tilia, germinan sólo hasta que la testa

es ablandada, lo que se consigue a través de degradación bioquímica en la digestión de los animales o microorganismos del ambiente inmersos en el suelo o simplemente por las características químicas del suelo (Kelly *et al.*, 1992). Estos factores pueden retardar la germinación de forma conjunta o sucesiva, por lo que es importante conocer cada una de las etapas de ésta.

La germinación comprende tres etapas sucesivas que se superponen parcialmente: La primera se considera la absorción de agua por imbibición causando su hinchamiento y la ruptura final de la testa, la segunda etapa comprende el inicio de la actividad enzimática y del metabolismo, respiratorio, traslocación y aislamiento de las reservas alimentarias en la regiones en crecimiento del embrión, finalmente la tercera etapa que toma en cuenta el crecimiento y la división celular que provoca la emergencia de la radícula y posteriormente de la plúmula (Besnier, 1989).

Existen muy pocos estudios sobre la germinación de *T. americana* var. *mexicana*, se ha reportado hasta un 74% de germinación en semillas, pero solo si las semillas son de colecta reciente y cuando las semillas aún permanecen en el árbol, con solo un 8% de germinación cuando las semillas tienen un año de colecta (Atrián-Mendoza, 2005). En este estudio el autor solo trabajó con semillas colectadas de un solo árbol, ubicado en la ciudad de Morelia, Michoacán. También, García-Magaña (1994) reporta hasta un 50% de germinación, pero coincide que sean semillas de colecta reciente y que deben de remojar por lo menos tres días, se indica en esta investigación que se trabajó con semillas colectadas en campo.

Tomando en consideración la problemática ya mencionada de *T. americana* var. *mexicana*, es importante hacer uso de nuevas metodologías que ayuden a maximizar la germinación *ex situ*, con el fin de conseguir la propagación de esta especie. El uso de la biotecnología en donde se considera el uso de hormonas que ayuden a aumentar el porcentaje de germinación, obteniendo a su vez

plántulas más vigorosas, puede ser una alternativa viable. Por esta razón el trabajo tuvo como objetivo determinar las condiciones óptimas de germinación bajo cultivo *in vitro* e invernadero, para la propagación de *T. americana* var. *mexicana*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta de frutos y selección de semillas

Los frutos de *T. americana* var. *mexicana* fueron colectados en el mes de octubre, durante la época de fructificación (Atrián-Mendoza, 2005), en 4 árboles de diferentes sitios del Estado de Michoacán (Cuadro 1) (Capítulo I).

**Cuadro1.** Ubicación en el Estado de Michoacán de los sitios donde se realizaron las colectas de los frutos de 4 árboles de *Tilia americana* var. *mexicana*.

No. Árbol	Sitio de colecta	Coordenadas de sitios de colecta	Altitud (msnm)
Árbol 1	Ichaqueo	19° 34' 00" N 101° 08' 45" O	2,300
Árbol 2	Paracho de Verduzco	19° 35' 41.09" N 102° 04' 13.13" O	2,300
Árbol 3	Tancítaro	19° 24' 21" N 102° 10' 17.19" O	2,160
Árbol 4	Tumbiscatío de Ruíz	18° 26' 24.60" N 102° 30' 26.54" O	1,800

Se eligió un árbol por sitio para la colecta de frutos de *T. americana* var. *mexicana*, debido al número reducido de éstos y al difícil acceso para obtener semillas de más árboles, así como a la inseguridad por la delincuencia organizada. En la mayoría de las localidades era el único que había o bien el único con producción de semilla. Una vez obtenidos los frutos de cada colecta, se procedió a liberarlos de peciolos y brácteas dejándolos limpios, para pesarlos. A partir de aquí se contabilizaron los frutos y semillas en cada etapa de selección. Posteriormente se retiraron todos aquellos frutos que tenían

perforaciones en el pericarpio. Después se colocaron los frutos en un mortero para fragmentar el pericarpio y extraer las semillas (Cuadro 2). Las semillas obtenidas se colocaron en agua para eliminar las vanas por flotación, dejando así solo las posiblemente viables (Doran *et al.*, 1983).

### **Escarificación y asepsia**

Debido a las particularidades de la testa en la semilla de *T. americana* var. *mexicana* y a los reportes sobre la germinación de ésta, fue necesario realizar una escarificación ácida previa a la siembra (Atrián-Mendoza, 2005).

La escarificación consistió en los siguientes pasos:

- 1.- Agregar a las semillas en un vaso de precipitado, una solución de HCl 10%, por 5 minutos.
- 2.- Transcurrido este tiempo se eliminó la solución de HCl.
- 3.- Después se aplicaron 100 ml de agua estéril para dejarlas en remojo por 3 días.

Pasado los 3 días se realizaron los siguientes pasos de asepsia:

- 1.- Se agregó una solución del detergente Hyclin® al 15 %, por 15 minutos.
- 2.- Transcurrido este tiempo se eliminó el Hyclin®.
- 3.- Después se agregó una solución de Etanol al 70%, por 3 minutos.
- 4.- De igual manera se eliminó la solución etanólica.
- 5.- Posteriormente se adicionó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, por 3 minutos.
- 6.- Cumplido el tiempo se eliminó el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

7.- Finalmente se agregó la solución de Hipoclorito de Sodio comercial al 40% (2.4% de cloro activo), por 30 minutos.

8.- Una vez cumplido el tiempo, se enjuagaron las semillas durante tres veces con agua estéril, para eliminar el exceso de cloro.

### **Germinación en invernadero**

Una vez realizada la escarificación y asepsia en las semillas de cada sitio, éstas fueron sembradas en turba comercial (peat moss) como sustrato, en 10 macetas de 14 cm de altura por 10 cm de diámetro, se sembraron 5 semillas por maceta, de cada localidad y se regaron cada tercer día. Las macetas se revisaron cada semana durante cuatro meses para obtener los porcentajes y tiempos de germinación.

### **Germinación *in vitro***

Para la siembra de semillas *in vitro*, previamente se prepararon medios de cultivo de Murashige y Skoog (1962), denominado MS, suplementado con 30 g/L de sacarosa, 0.05 mg/L de benciladenina (BA) y 0.1 mg/L de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) y 8 g/L de agar bacteriológico (Bioxón®), con un pH de 5.7, en frascos de cultivo de vidrio con capacidad de 125 mL, en base a lo publicado por Atrián-Mendoza (2005). La esterilización de frascos con 20 mL de medio de cultivo se realizó en autoclave a 15 lbs/pulg<sup>2</sup> por 20 min.

La siembra fue realizada en una campana de flujo laminar, sembrando 15 frascos con semillas de cada localidad (15 frascos por tratamiento): para el primer tratamiento, se realizó la siembra de una semilla por frasco (T1); en el segundo tratamiento se sembraron 3 semillas por frasco (T2); y en el tercer tratamiento, se cultivaron 5 semillas por frasco (T3).

La incubación de las semillas fue en un cuarto de cultivo con una intensidad de 132  $\mu\text{E m/seg}^2$  con un fotoperíodo de 16 horas luz, a una temperatura de 25°C.

Se determinó el porcentaje de germinación total y los tiempos inicial y final de la germinación, para cada tratamiento y localidad.

## RESULTADOS

La colecta y selección de frutos y semillas de *T. americana* var. *mexicana*, permitió cuantificar y comparar, primeramente, el número de frutos que se colectaron de cada uno de árboles, así como el número de semillas obtenidas. Lo anterior demostró que no siempre el número de frutos es representativo del número de semillas (Figura 1). En general los frutos del cirimo solo contienen una semilla, muy raramente dos.

En el cuadro 2, se muestra el número de frutos colectados y semillas obtenidas de *T. americana* var. *mexicana* para cada uno de los árboles. En éste se observa que las del Árbol 4 (Tumbiscatío), donde se colectó el mayor número de frutos (846), finalmente se obtuvieron 173 semillas aparentemente viables después del proceso de selección. En el caso de las semillas colectadas en el Árbol 2 (Paracho), se colectó el menor número de frutos, obteniendo solo 223 sanos, de los cuales finalmente se lograron 102 semillas aparentemente viables. En la Figura 1 se puede apreciar como el número de frutos colectados en el Árbol 2 es mayor al número de semillas obtenidas y aparentemente viables.



**Figura 1.** Comparación entre el número de frutos colectados y el número de semillas obtenidas después del proceso de selección de *Tilia americana* var. *mexicana* (Semillas del Árbol 2, sitio de colecta de Paracho).

**Cuadro 2.** Número (#) y porcentaje (%) de frutos colectados y semillas obtenidas de 4 árboles de *Tilia americana var. mexicana*.

Parámetro	Árbol 1		Árbol 2		Árbol 3		Árbol 4	
	CANTIDAD							
	#	%	#	%	#	%	#	%
Número de frutos	316	100	223	100	269	100	846	100
Frutos descartados	104	32.91	27	12.10	36	13.38	293	31.08
Frutos vacíos	14	4.4	76	34.08	41	15.24	101	11.93
Semillas en frutos	198	62.65	120	53.81	192	71.37	452	53.42
Semillas descartadas por flotación	93	29.43	18	8.7	85	31.59	279	32.97
Total de semillas obtenidas	105	33.22	102	45.73	107	39.77	173	20.44

Los datos del cuadro 2, convertidos en porcentaje, permiten ver, como en la colecta del Árbol 4 (Tumbiscatío), hubo una mayor pérdida de frutos y semillas en el proceso de selección, logrando obtener tan solo un 20.44% de semillas. En cambio, la colecta del Árbol 2 (Paracho), no hubo una pérdida considerada ya que se obtuvo un 45.73% de semillas.

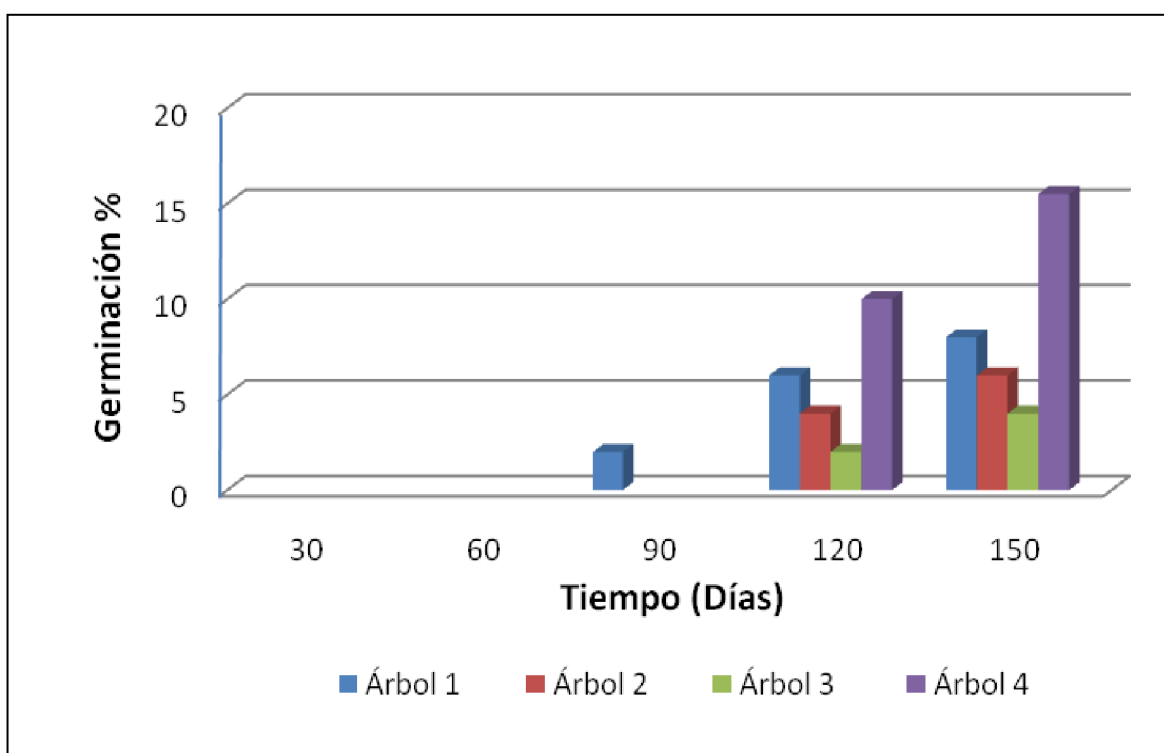
Una vez seleccionado los frutos y extraído las semillas, estas últimas se sometieron a dos métodos de germinación, uno bajo cultivo en invernadero y el otro bajo cultivo *in vitro*.

### Germinación en invernadero

En las semillas germinadas en invernadero, se observó el inicio de la germinación a los 90 días después de la siembra, con bajos porcentajes de germinación solo en las semillas del Árbol 1 (Ichaqueo), las cuales mostraron 2% de germinación. Hasta los 120 días, la germinación se presentó en las semillas de los otros tres árboles, tiempo en el cual las del Árbol 4 (Tumbiscatío) mostraron un 10% de germinación, las de menor germinación a este tiempo fueron las del Árbol 3 (Tancítaro) con solo 2% de germinación (Figura 2). Es importante hacer notar que por cada maceta se sembraron 5 semillas de cirimo

de las cuales en la mayoría de los casos solo una germinó. A los 150 días después de la siembra se consiguieron los máximos porcentajes de germinación, siendo las del Árbol 4 las que presentaron el mayor porcentaje (15.5%), seguido de las de Árbol 1 (Ichaqueo) (6%), Árbol 2 (6%) y por último las del Árbol 3 (4%) (Figura 2). En la figura 3A se muestran plántulas de cirimo de semillas colectadas en el Árbol 1 (Ichaqueo), a los 90 días de su cultivo en invernadero.

Los resultados del proceso de germinación en invernadero con la siembra de 5 semillas por maceta, permitió replantear el diseño para germinación *in vitro*, por lo que se diseñaron tres diferentes tratamientos: siembra de una semilla por frasco de cultivo; 3 y 5 semillas. Debido a la falta de semillas y al largo tiempo de germinación en invernadero, no se llevó a cabo el experimento de germinación bajo esta condición de cultivo.



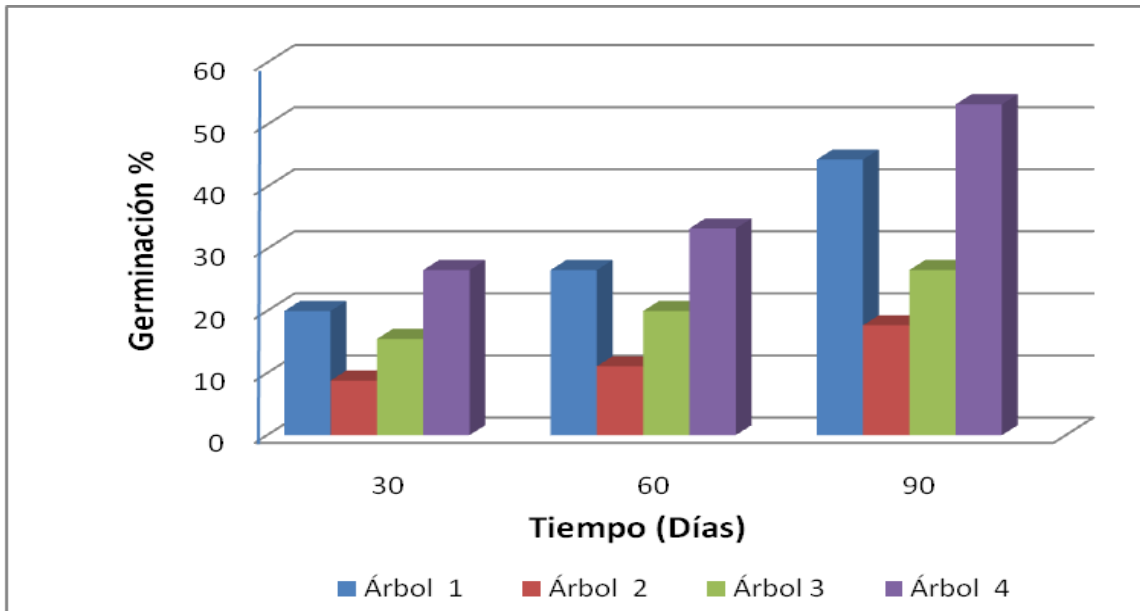
**Figura 2.** Porcentaje de germinación de semillas de *T. americana* var. *mexicana* en condiciones de cultivo de invernadero.



**Figura 3.** Plántulas de *T. americana* var. *mexicana* germinadas en invernadero (150 días de cultivo) (A) y en cultivo *in vitro*: Rompimiento de testa, 30 días de cultivo (B); Emergencia de radícula y desarrollo de hojas cotiledonares, 60 días de cultivo (C); Plántula de 90 días de cultivo (D).

### **Germinación *in vitro***

En cuanto al proceso de germinación *in vitro*, este inició a los 30 días después del cultivo de las semillas de los 4 árboles. En la figura 4 se muestran los porcentajes de germinación por árbol, sin tomar en consideración el número de semillas sembradas por frasco de cultivo.



**Figura 4.** Porcentaje de germinación total (T1, T2 y T3) de semillas de *T. americana* var. *mexicana* en condiciones de cultivo *in vitro* por árbol, durante 90 días.

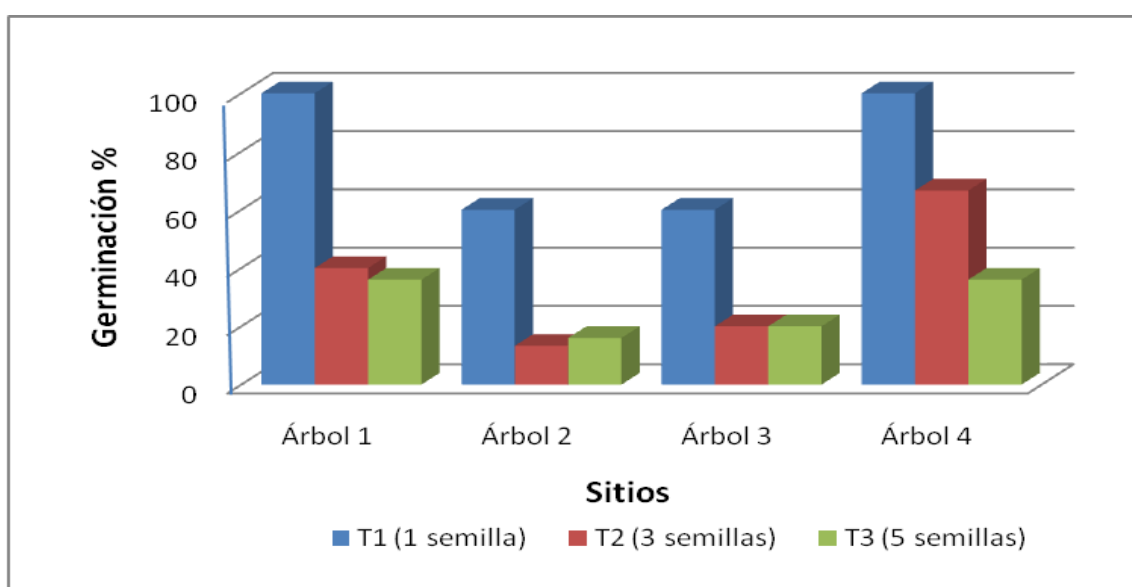
Las semillas de los 4 árboles mostraron un aumento en el porcentaje de la germinación en general, como se observa en la figura 4. Las provenientes de los Árboles 1 (Ichaqueo) y 4 (Tumbiscatío), fueron las de mayor porcentaje de germinación, alcanzando el 44.4% y 53.3% a los 90 días del cultivo, respectivamente. Las de los Árboles 2 (Paracho) y 3 (Tancítaro) solo obtuvieron un 17.7% y un 26.6%, respectivamente.

Durante este proceso de germinación *in vitro*, primeramente se observó la emergencia de radícula (Figura 3B). A los 60 días del cultivo pudo observarse el desarrollo de las hojas cotiledonares (Figura 3C) y a los 90 días el desarrollo de plántulas con hojas verdaderas en desarrollo (Figura 3D).

Los valores de los porcentajes de germinación por árbol, presentados por el número de semillas cultivadas por frasco, muestran claramente que con el tratamiento T1 (1 semilla/frasco) se obtuvieron los porcentajes más altos de

germinación, obteniendo hasta un 100% en semillas de los Árboles 1 y 4, con un 60% en las de los Árboles 2 y 3 (Figura 5).

Con el tratamiento T2 (3 semillas/frasco), los porcentajes de germinación fueron menores al 38% en semillas de los Árboles 1, 2 y 3, con un 62% en semillas del Árbol 4 (Tumbiscatío). Las semillas en T3 (5 semillas/frasco) mostraron porcentajes de germinación menores a 35% para las semillas colectadas en los 4 árboles (Figura 5).



**Figura 5.** Porcentajes de germinación en semillas cultivadas *in vitro* por la siembra de una semilla (T1), 3 semillas (T2) y 5 semillas (T5) de cada uno de los árboles, a los 90 días del cultivo.

### **Eficiencia de germinación respecto al número de frutos colectados**

Debido a que los resultados anteriores solo describen los porcentajes de germinación, considerando el número de semillas cultivadas tanto en invernadero como *in vitro*, fue importante determinar los porcentajes de germinación reales, realizando la diferencia entre el número de frutos colectados (total de semillas), con respecto al número de semillas germinadas por árbol.

En el cuadro 3 se muestran los porcentajes de germinación reales, obtenidos por el número de frutos colectados, las semillas cultivadas y las semillas que germinaron. En el Árbol 4 (Tumbiscatío) se colectó el mayor número de frutos, considerándolo como el 100%, en base a esto, las semillas de este árbol presentaron solamente el 2.86% de germinación en invernadero y un 7.36% en cultivo *in vitro*.

La colecta del Árbol 1 (Ichaqueo) presentó 1.99% de semillas germinadas en invernadero y 11.96% en cultivos *in vitro*, este último porcentaje fue el más alto con respecto a los otros tres árboles. Las semillas colectadas del Árbol 3 (Tancítaro) presentaron 3.18% de germinación en semillas cultivadas en invernadero, siendo este el porcentaje más alto con respecto a las otros árboles (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Porcentajes de germinación de *Tilia americana* var. *mexicana* con respecto al total de frutos colectados en cuatro árboles.

TRATAMIENTO	GERMINACIÓN REAL (%)			
	Árbol 1	Árbol 2	Árbol 3	Árbol 4
<b>Frutos colectados</b>	33.22	45.73	39.77	100 (846)
<b>Semillas germinadas en invernadero (5)</b>	1.99	2.74	3.18	2.86
<b>Semillas germinadas <i>in vitro</i> (5)</b>	11.96	7.31	9.54	7.36
<b>Semillas germinadas <i>in vitro</i> (3)</b>	13.29	6.09	5.30	13.63
<b>Semillas germinadas <i>in vitro</i> (1)</b>	33.22	27.44	23.86	20.44

## DISCUSION

*Tilia mexicana*, una planta leñosa con dificultades de propagarse tanto sexual como asexualmente (García-Magaña, 1994), es un ejemplo de las miles de especies que requieren métodos alternativos a los convencionales para lograr no solo su propagación, sino la conservación de su germoplasma, ya que es una especie en peligro de extinción (SEMARNAT, 2010). En la presente investigación se presentan resultados alentadores para conseguirlo, ya que fue posible su germinación *in vitro* en porcentajes del 100% en semillas provenientes

de los Árboles 1 (Ichaqueo) y 4 (Tumbiscatío), correspondiente a porcentajes reales de germinación de 33.22% y 20.44%, respectivamente. Los porcentajes de germinación en invernadero fueron los más bajos, independientemente de los árboles.

Los resultados de la germinación concuerdan con la aseveración de Baily (1961), quien reporta que la recolección temprana de frutos de *Tilia* cuando éstos se tornan color café tenue, es recomendable para realizar su siembra, y que los mayores porcentajes de germinación de semillas de *Tilia* resultan cuando los frutos son colectados en fechas muy cercanas a la época de caída de los frutos y sembradas de inmediato.

En invernadero, los porcentajes reportados por García-Magaña (1994) no concuerdan con los obtenidos en la presente investigación, quien consigue hasta un 50% de germinación en semilla de cirimo de reciente colecta, ya que las semillas de mayor porcentaje fueron las del Árbol 4 (Tumbiscatío) (15%) que correspondió a un porcentaje de germinación real del 2.86%. Sin embargo, Atrián-Mendoza (2005) obtuvo porcentajes de germinación del 10% en semilla de reciente colecta sembradas en invernadero, resultado más acorde a lo obtenido al sembrar las semillas colectadas de los diferentes árboles.

Con los tratamientos de siembra de 1, 3 y 5 semillas por frasco en cultivos *in vitro*, pudo observarse una relación directa entre el número de semillas y el porcentaje de germinación, obteniéndose los mayores porcentajes al cultivar una semilla por frasco de cultivo. La presencia de ciertas sustancias inhibitoras presentes en las mismas semillas pudo ser lo que determinó los bajos porcentajes de germinación al cultivar 3 ó 5 semillas por frasco de cultivo (Rowe y Bazich, 2008).

Los cultivos *in vitro* de semillas de *T. americana* var. *mexicana* muestran el éxito en la germinación, ya que independientemente del Árbol, los porcentajes de

germinación siempre fueron más altos que los logrados en condiciones de invernadero. Sin embargo existen diferencias de los porcentajes de germinación entre cada Árbol, con 100% de germinación para semillas del Árbol 1 (Ichaqueo) y Árbol 4 (Tumbiscatío), 60% para las provenientes de los Árboles 2 (Paracho) y 3 (Tancítaro), al cultivarse una semilla por frasco de cultivo.

Las condiciones de cultivos *in vitro* como alta humedad relativa (100%) y abastecimiento óptimo de nutrimentos por el medio de cultivo, así como las condiciones controladas de luz, temperatura y pH, favorecen la germinación en diferentes tipos de semillas como *Pinus* spp, cactáceas, orquídeas, entre otras plantas (Clyton *et al.*, 1990; George y Debergh, 2008).

Este trabajo constituye un éxito en el cultivo *in vitro* de semillas de *T. americana* var. *mexicana*, ya que con este método pueden obtenerse altos porcentajes de germinación, cultivando semillas provenientes de diferentes árboles y diversas localidades, lo que permite tener una mayor variabilidad genética y conseguir su propagación con propósitos de repoblación o conservación.

## CONCLUSIONES

Se logró la germinación de semillas de *T. americana* var. *mexicana* tanto en cultivos *in vitro* como en invernadero. En cultivos *in vitro* se obtuvieron los menores tiempos para la germinación y los mayores porcentajes de germinación. Los cultivos *in vitro* de una semilla/frasco de cirimo favorecen la germinación, independientemente del árbol o de sitio de colecta. Las semillas procedentes de árboles de Tumbiscatío e Ichaqueo presentaron los mayores porcentajes de germinación.

## LITERATURA CITADA

Atrián, M.E. 2005. Establecimiento de un sistema de regeneración *in vitro* de *Tilia mexicana* Schlttdl. (Tiliaceae). Tesis de Licenciatura, Fac. de Biología, UMSNH.

Besnier Romero, F. 1989. Semillas. Biología y tecnología. Ed. Mundi-Prensa, Madrid. 637p.

Clayton, P.; Hubstenberger, J. Philips, G. Micropropagation of members of the Cactaceae, subtribe *Cactine*. J. Amer. Soc. Hort. Sci (E.U.) 115(2):337-343, 1990.

Diario Oficial de la Federación. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Segunda Sección. Secretaría de medio ambiente y recursos naturales. pp. 95-190.

García-Magaña, J.J., 1994. Tratamientos pre germinativos para la propagación en vivero *Tilia mexicana* Schlecht.. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. INIFAP. CIRPAC. *Boletín Técnico*, 27:3-6.

George, E. F. 2008. Deberg, P. C. Micropropagation: Uses and Methods. IN: Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd. Edition Wageningen, The Netherlands. Springer. pp: 29-64.

Kelly, K. M., J. Van Standen y W. E. Bell. 1992. Seed coat structure and dormancy. Plant Growth Regulat. II, 201-209.

Murashige, T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*. 15:473-497.

Pavón, N.P., V. Rico-Gray, 2000. An endangered and potentially economic tree of Mexico: *Tilia mexicana* (Tiliaceae). *Economic Botany*, 54:113-114).

Rowe, D.B., F.A. Blazich, 2008. *Tilia* L., linden or basswood. En: The woody plant seed manual. Agr. (Bonner F.T., R.P. Karrfalt, eds.). U.S. Dept. Agr. For. Serv., Washington, D.C., *Hdbk 727*:1113-1118.

SEMARNAT, 2010. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Protección ambiental - especies nativas de México de flora y fauna silvestre. Diario Oficial de la Federación, 30 de diciembre 2010, 77p.

### CAPÍTULO III

#### DESARROLLO INICIAL DE PLANTAS DE CIRIMO (*Tilia americana* var. *mexicana*) (TILIACEAE) BAJO CULTIVO *IN VITRO* E INVERNADERO

##### RESUMEN

Para conocer el desarrollo inicial, de plantas de semillas de *Tilia americana* var. *mexicana* Schlttl, de cuatro arboles de Michoacán (Tumbiscatío, Ichaqueo, Paracho y Tancítaro), en condiciones de invernadero e *in vitro*, se tomaron mediciones de características relacionadas con el desarrollo de las plantas. A partir de la fecha de trasplante, se registraron las mediciones cada 30 días, durante 180 días. Se establecieron las plantas bajo un diseño completamente al azar, en donde cada tratamiento (árbol) estuvo representado por 25 plantas. Obteniendo el árbol 1 (Ichaqueo) y árbol 4 (Tumbiscatío), el mejor desarrollo en la mayoría de los parámetros medidos, tanto en condición invernadero como *in vitro*. En invernadero las plantas del árbol 4 y del 1, mostraron en promedio un desarrollo mayor a los 180 días de edad, en la altura del tallo (12.39 y 15.23 cm), área foliar (29.27 y 13.18 mm<sup>2</sup>) y longitud de raíz (9.50 y 10.50 cm), en comparación con las plantas del árbol 2 (Paracho) y el árbol 3 (Tancítaro), donde el desarrollo fue menor, pero mayor en número de hojas (7.87 y 6.68). Para *in vitro* de igual manera, las plantas del árbol 4 y 1, tienen mayor altura de tallo, (3.07 y 2.63 cm), número de raíces secundarias (7.07 y 7.13) y longitud de raíz (1.80 y 1.40 mm<sup>2</sup>). Solamente en el número de hojas Tancítaro (árbol 3) y Paracho (árbol 2) presentan un mayor número (7.60 y 7.87)

En cuanto a la diferencias en el desarrollo de las plantas entre las localidades de colecta, dentro de cada condición y edad de desarrollo. Las plantas de invernadero e *in vitro* presentaron diferencias altamente significativas entre las localidades de colecta ( $P < 0.013$ ) y ( $P < 0.0012$ ) respectivamente, durante todo el período de evaluación, en las características altura, área foliar, longitud de raíz y número de yemas para invernadero y altura de tallo y longitud de raíz para *in vitro*.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas al igual que cualquier otro ser vivo, cumplen un ciclo vital. Este ciclo, está constituido por una serie de etapas en las que el desarrollo y crecimiento, trabajan conjuntamente. (Fernández, *et. al*, 1986). Es importante distinguir los dos conceptos anteriores, porque si bien trabajan en conjunto, tienen cada uno su propia acción.

El crecimiento es el aumento de tamaño en la planta, que puede medirse en materia seca o dimensiones, y se origina como consecuencia de formaciones de nuevas células, de la expansión de células constituyentes y de la producción de asimilados. En cuanto al desarrollo, es el paso de la planta, desde la germinación hasta la madurez, por una serie de fases que, en la mayor parte, están bien definidas (will, 1989).

El cirimo es muy apreciado en Michoacán por su uso en la fabricación de guitarras y artesanías (Bravo-Marentes y López-Gómez, 1999), además de tener uso medicinal (Avilés-Montes, 2008), por lo que ha sido sobreexplotado. Por esta razón, muchas de las poblaciones reportadas en la literatura, actualmente ya no existen, y las pocas poblaciones remanentes presentan en ocasiones un solo individuo o muy pocos individuos establecidos en zonas de difícil o peligroso acceso. Debido a esta situación, actualmente está catalogado como especie en peligro de extinción por la Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-2010 (SEMARNAT, 2010).

Los reportes indican que *Tilia mexicana* tiene problemas de propagación debido a características propias de su semilla (Rowe y Bazich, 2008) y que al parecer pueden ser superados con tratamientos pre-germinativos (García-Magaña, 1994). En las poblaciones visitadas durante la colecta de material para la realización del presente estudio, no se observó presencia de plántula alguna de la especie.

Se han realizado algunos estudios sobre la especie, como el desarrollado con fines farmacológicos, en donde se le propagó por esquejes bajo dos tratamientos: T1 - los esquejes se mantuvieron a la temperatura del invernadero ( $T_i$ ) de  $31 \pm 2$  °C, temperatura del sustrato ( $T_s$ ) de  $28 \pm 1$  °C y humedad relativa (Hr)  $27 \pm 2$  %; T2 - con microclima utilizando un plástico para cubrir las charolas, manteniendo la temperatura del microclima ( $T_m$ ) en  $29 \pm 2$  °C, la  $T_s$  en  $26 \pm 2$  °C y la Hr en  $87.3 \pm 2$  %; y en donde T2 fue el mejor tratamiento obteniendo hojas de 3 a 10 cm del ápice al peciolo en la octava semana de cultivo (Avilés-Montes, 2008).

Se ha tratado de propagar por enraizamiento de estacas probando diferentes fechas de colecta y tratamientos tomando en cuenta el largo y diámetro de las estacas de cirimo, se obtuvo enraizamiento sólo en las estacas colectadas en el mes de septiembre con un porcentaje promedio de 39.6 %, sin encontrar diferencias significativas entre tratamientos; cuando evaluaron el número de raíces encontraron valores promedio de 2.1 a 3.1; en el diámetro de raíces se encontraron diferencias significativas que variaron de 0.14 a 0.47 mm; a los 60 días de tratamiento la longitud de las raíces fue de 0.44 a 1.4 cm; se presentó formación de callo en los cuatro períodos de evaluación y varió de 6.3 a 33.1 siendo esta en el mes de diciembre (Muñoz-Flores *et al.*, 2011).

*Tilia mexicana* se ha propagado con éxito tanto *in vitro* como *ex vitro* alcanzando tamaños de 4 a 5 cm de altura, a su vez de estas se han utilizado las yemas axilares y apicales para regenerar plántulas por brotación múltiple, obteniendo de 1 a 7.75 brotes por yema bajo 25 diferentes tratamientos; los brotes presentaron entre 1.6 y 4.5 cm de altura; en los brotes se utilizaron siete diferentes tratamiento de ácido indolbutírico (AIB) para inducir la formación de raíces, lográndose sólo en cuatro tratamientos de 1 a 6 raíces por brote con tamaños que variaron entre 1.6 y 3.5 cm, que se formaron entre los 30 y los 50 días de prueba (Salgado-Garciglia *et al.*, 2010).

A pesar de los estudios realizados al cirimo, poco se sabe aún sobre su desarrollo, por lo que el objetivo del presente trabajo fue analizar el desarrollo inicial de *Tilia mexicana* en condiciones de vivero e *in vitro* de semillas procedentes de cuatro localidades de distribución natural de la especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Trasplante en invernadero**

Se colectaron semillas de *Tilia americana* var. *mexicana* en cuatro arboles de Michoacán: árbol 1 (Ichaqueo), árbol 2 (Paracho), árbol 3 (Tancítaro) y árbol 4 (Tumbiscatío). Debido a la inseguridad y el difícil acceso solo se pudo colectar un solo árbol de cada localidad. Las semillas se pusieron a germinar en condiciones de laboratorio, una vez que las semillas germinaron, con una edad aproximada de 90 días, las plántulas fueron trasplantadas en macetas usando como sustrato una mezcla de turba-agrolita en proporción de 1:1, bajo condiciones de alta humedad relativa, regando cada tercer día y fertilizando cada mes con Triple plus (17-17-17, N-P-K).

### **Trasplante *in vitro***

Con el propósito de determinar cómo se desarrollan y crecen las plántulas de *Tilia americana* var. *mexicana*, en condición *in vitro*, estas se trasplantaron a los 90 días de edad aproximadamente, en frascos de vidrio con medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962), el cual fue suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 5.0 mg L<sup>-1</sup> de Ácido Idolbutírico (AIB) ) y 8 g L<sup>-1</sup> de agar bacteriológico (Bioxón®), con un pH de 5.7. Una vez preparado el medio de cultivo, este se vació en los frascos, para esterilizarlo en autoclave por 25 minutos. Transcurrido el tiempo de esterilización se dejaron enfriar los medios de cultivo. Posteriormente, en una campana de flujo laminar, se trasplantó una plántula por frasco. Todas las plántulas se mantuvieron en un cuarto de cultivo con una

intensidad de 132  $\mu\text{E m seg}^{-2}$  y un fotoperiodo de 16 horas luz, a una temperatura de 25 °C.

### VARIABLES EVALUADAS

En cada condición: invernadero e *in vitro* se tomaron mediciones de características relacionadas con el desarrollo de las plantas. Las mediciones fueron tomadas con ayuda de un vernier digital y el área foliar se realizó con láminas de acetato. A partir de la fecha de trasplante, se tomaron mediciones cada 30 días durante 180 días (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Variables evaluadas, unidades de evaluación y simbología utilizada en cada condición de evaluación.

Variable	Unidades	Simbología	Condición	
Longitud de raíz	cm	longraiz	invernadero	<i>in vitro</i>
Presencia de raíces secundarias	- / +	raizsec	invernadero	<i>in vitro</i>
Número de raíces secundarias	número	nraizsec	invernadero	<i>in vitro</i>
Altura del tallo	cm	alt	invernadero	<i>in vitro</i>
Número de yemas	número	nyemas	invernadero	-
Número de hojas	número	nhojas	invernadero	<i>in vitro</i>
Área foliar	mm <sup>2</sup>	areafol	invernadero	-

### ANÁLISIS DE DATOS

En las dos condiciones: invernadero e *in vitro*, se establecieron las plantas bajo un diseño completamente al azar, en donde cada tratamiento (localidad) estuvo representado por 25 plantas. Los datos obtenidos en las mediciones, para las dos condiciones bajo las cuales se llevó a cabo el experimento, fueron analizados con el paquete estadístico SAS (2004). Se obtuvieron los valores promedio con el procedimiento MEANS para cada localidad de colecta, en cada condición de desarrollo y edad de medición. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza para cada variable evaluada con el procedimiento GLM, para saber si había diferencias en el desarrollo de las plantas entre las localidades de colecta, dentro de cada condición y edad de desarrollo, utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + L_i + e_{ij},$$

Donde  $Y_{ij}$  es el  $j$ -ésimo valor de la variable evaluada en la  $i$ -ésima localidad,  $\mu$  es la media general de la población,  $L_i$  es el efecto de la  $i$ -ésima localidad, y  $e_{ij}$  es el error experimental asociado a la  $j$ -ésima observación de la  $i$ -ésima localidad.

Se exploró la relación entre las características medidas con una correlación de Pearson utilizando el procedimiento CORR, que proporciona la significancia del análisis.

## RESULTADOS

### Valores promedio de las características medidas

En condiciones de invernadero las plantas más altas fueron las provenientes de el árbol 1 (Ichaqueo) y el árbol 4 (Tumbiscatío), con alturas de entre 7.15 y 15.23 cm; las plantas de árbol 2 (Paracho) y el árbol 3 (Tancítaro), presentaron alturas de entre 5.54 y 9.30 cm entre los 30 y los 180 días de edad (Cuadro 2). Aunque el número de hojas fue similar en las cuatro localidades, el mayor número de hojas se presentó a los 120 días de desarrollo, después del cual hubo una tendencia a disminuir (Cuadro 2), encontrándose el menor número de hojas promedio en las plantas de Tumbiscatío (árbol 4) (2.55) y el mayor en las plantas provenientes de Tancítaro (árbol 3) (10.68). El número de yemas promedio fue mayor en Tumbiscatío (árbol 4) (entre 7.96 y 13.40) y menor en Paracho (árbol 2) (entre 6.22 y 7.57); tanto en las plantas de Tancítaro (árbol 3) como en las de Tumbiscatío (árbol 4), el número de yemas fue más variable con el tiempo de desarrollo que en las plantas de las otras dos localidades (Cuadro 2). El área foliar fue mayor en las plantas de Tumbiscatío (árbol 4) (entre 9.29 y 29.27 mm<sup>2</sup>) y las de Tancítaro (árbol 3) presentaron la menor área foliar (entre 6.59 y 8.17 mm<sup>2</sup>) (Cuadro 2). El número de raíces secundarias presentó el menor valor en las plantas procedentes de Ichaqueo (árbol 1) (2.17) a los 30 días de desarrollo y el mayor número en Tancítaro (árbol 3) a los 180 días de desarrollo (15.00)

(Cuadro 2). La longitud de la raíz fue, en promedio, mayor en las plantas de Ichaqueo (árbol 1) (de 5.60 a 10.50 cm) y los menores valores se presentaron en las de Tancítaro (árbol 3) (de 4.50 a 7.70 cm) (Cuadro 2).

En condiciones de *in vitro* las plantas más altas fueron las provenientes de Tumbiscatío (árbol 4) seguidas por las de Ichaqueo (árbol 1) con alturas de entre 1.43 y 3.07 cm; las plantas de Paracho (árbol 2) y Tancítaro (árbol 3) presentaron alturas de entre 0.68 y 1.94 cm entre los 30 y los 180 días de edad (Cuadro 2). En promedio, el número de hojas fue mayor en las plantas procedentes de semillas del árbol 2 y el árbol 3 (de 1.87 a 7.87) y menor en las procedentes del árbol 1 y del árbol 4 (de 1.87 a 7.07); en esta condición de desarrollo el número de hojas aumentó, conforme avanzó la edad de desarrollo (Cuadro 2). El número de raíces secundarias presentó los menores valores en las plantas procedentes del árbol 2 (de 1.13 a 5.53) y los mayores números se presentaron en las plantas procedentes del árbol 1 y del 4 (de 1.13 a 7.13) y en todas las plantas tendió a incrementarse con la edad (Cuadro 2). La longitud de la raíz se incrementó conforme avanzó la edad y varió de una localidad a otra, los menores valores se presentaron en las plantas procedentes del árbol 2 y del 3 (de 0.30 a 1.40 cm) y los mayores del árbol 1 y del árbol 4 (de 0.30 a 1.90 cm) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Valores promedio de las variables evaluadas en cada condición de desarrollo, edad de medición y localidad de colecta de *Tilia americana* var. *mexicana*.

Variable	Edad	Invernadero				<i>in vitro</i>			
		Ichaqueo Árbol 1	Paracho Árbol 2	Tancítaro Árbol 3	Tumbiscatío Árbol 4	Ichaqueo Árbol 1	Paracho Árbol 2	Tancítaro Árbol 3	Tumbiscatío Árbol 4
Alt	30	7.15	5.54	5.88	7.33	1.43	0.97	0.68	1.61
Alt	60	8.08	5.90	6.37	8.35	1.69	1.13	0.94	1.87
Alt	90	9.78	6.36	6.96	9.90	2.01	1.29	1.21	2.15
Alt	120	11.80	6.96	7.63	10.89	2.33	1.44	1.47	2.40
Alt	150	13.44	7.67	8.41	11.72	2.63	1.57	1.72	2.74
Alt	180	15.23	8.52	9.30	12.39	2.93	1.71	1.94	3.07
nhojas	30	4.48	4.13	3.96	4.13	1.87	2.00	1.87	1.93
nhojas	60	6.64	6.52	7.14	5.90	1.93	2.33	2.87	1.67
nhojas	90	7.18	7.04	9.95	5.80	2.20	3.73	3.80	2.67
nhojas	120	9.09	7.26	10.68	6.40	3.27	5.33	5.60	4.13
nhojas	150	8.32	6.87	9.27	4.35	4.60	6.73	6.67	5.60
nhojas	180	5.68	7.87	6.68	2.55	6.07	7.87	7.60	7.07
nyemas	30	8.00	6.22	6.00	7.96	---	---	---	---
nyemas	60	8.00	6.83	8.59	10.05	---	---	---	---
nyemas	90	8.64	6.74	10.50	11.50	---	---	---	---
nyemas	120	8.14	6.74	9.27	11.45	---	---	---	---
nyemas	150	9.00	7.57	8.36	12.50	---	---	---	---
nyemas	180	6.00	7.35	6.77	13.40	---	---	---	---
areafol	30	7.96	6.97	6.59	9.29	---	---	---	---
areafol	60	9.17	7.27	6.98	13.34	---	---	---	---
areafol	90	10.16	7.57	7.21	17.19	---	---	---	---
areafol	120	11.02	7.93	7.51	20.60	---	---	---	---
areafol	150	12.04	8.27	7.80	24.09	---	---	---	---
areafol	180	13.18	8.61	8.17	29.27	---	---	---	---
nraizsec	30	2.17	2.57	2.35	2.87	1.13	1.13	1.07	1.13
nraizsec	60	5.41	5.52	4.36	5.60	1.33	1.27	1.40	1.67
nraizsec	90	7.41	7.61	6.59	7.60	2.60	1.60	2.40	2.67
nraizsec	120	9.50	9.61	9.41	9.70	4.47	2.73	3.60	4.13
nraizsec	150	11.55	11.61	11.77	11.70	5.80	4.27	4.93	5.60
nraizsec	180	14.09	13.73	15.00	13.70	7.13	5.53	6.33	7.07
longraiz	30	5.60	4.30	4.50	6.00	0.40	0.30	0.30	0.30
longraiz	60	6.70	4.90	5.00	6.50	0.80	0.50	0.50	0.70
longraiz	90	7.10	5.60	5.60	6.90	1.10	0.70	0.70	1.00
longraiz	120	8.60	6.30	6.20	7.20	1.10	0.90	1.10	1.30
longraiz	150	9.90	7.20	6.90	8.50	1.40	1.20	1.20	1.60
longraiz	180	10.50	8.30	7.70	9.50	1.80	1.40	1.40	1.90

### **Análisis de varianza de las características entre localidades**

En condiciones de invernadero las plantas presentaron diferencias altamente significativas entre arboles ( $P < 0.013$ ), durante todo el período de evaluación, en las características altura, área foliar, longitud de raíz y número de yemas (Cuadro 3). El número de hojas no presentó diferencias significativas entre arboles a los 30 días de desarrollo ( $P = 0.66$ ), fue parcialmente significativo a los 60 días ( $P = 0.07$ ) y posteriormente la diferencia entre arboles fue altamente significativa ( $P < 0.0001$ ) (Cuadro 3). El número de raíces secundarias presentó diferencias altamente significativas entre plantas provenientes de cada árbol, durante los primeros 90 días de desarrollo ( $P \leq 0.0032$ ), posteriormente fue similar entre arboles ( $P \geq 0.76$ ) y volvieron a presentarse diferencias durante la última medición ( $P < 0.009$ ) (Cuadro 3).

En condiciones de *in vitro* las plantas presentaron diferencias altamente significativas entre los arboles colectados ( $P < 0.0012$ ), durante todo el período de evaluación, en las características altura y longitud de raíz (Cuadro 3). El número de hojas no presentó diferencias significativas entre arboles a los 30 días de desarrollo ( $P = 0.51$ ), pero posteriormente la diferencia entre arboles fue altamente significativa ( $P < 0.0001$ ) (Cuadro 3). El número de raíces secundarias no presentó diferencias entre arboles durante los primeros 60 días de desarrollo ( $P \geq 0.31$ ), pero posteriormente se presentaron diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.007$ ) durante el resto del tiempo de evaluación (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Cuadrados medios (C.M.) y significancia (P>F) de los análisis de varianza entre localidades de muestreo de *Tilia americana var. mexicana* para cada condición de desarrollo y edad de medición.

Variable	Edad	Invernadero		<i>in vitro</i>	
		C.M.	P>F	C.M.	P>F
Alt	30	18.41	<0.0001	2.72	<0.0001
Alt	60	32.42	<0.0001	2.98	<0.0001
Alt	90	74.85	<0.0001	3.53	<0.0001
Alt	120	125.08	<0.0001	4.13	<0.0001
Alt	150	164.64	<0.0001	5.50	<0.0001
Alt	180	133.66	<0.0001	7.10	<0.0001
Areafol	30	33.41	<0.0001	---	---
Areafol	60	178.43	<0.0001	---	---
Areafol	90	443.76	<0.0001	---	---
Areafol	120	767.58	<0.0001	---	---
Areafol	150	1193.87	<0.0001	---	---
Areafol	180	1876.21	<0.0001	---	---
Longraiz	30	148.19	<0.0001	0.17	0.0012
Longraiz	60	142.53	<0.0001	0.54	<0.0001
Longraiz	90	144.07	<0.0001	0.93	<0.0001
Longraiz	120	143.37	<0.0001	1.37	<0.0001
Longraiz	150	137.77	<0.0001	1.62	<0.0001
Longraiz	180	209.86	<0.0001	2.05	<0.0001
Nhojas	30	1.10	0.6687	0.06	0.5113
Nhojas	60	5.39	0.0744	4.09	<0.0001
Nhojas	90	65.76	<0.0001	9.44	<0.0001
Nhojas	120	78.30	<0.0001	17.66	<0.0001
Nhojas	150	95.54	<0.0001	15.31	<0.0001
Nhojas	180	109.06	<0.0001	9.48	0.0006
Nraizsec	30	2.07	0.0032	0.02	0.9279
Nraizsec	60	7.30	<0.0001	0.46	0.3117
Nraizsec	90	5.11	0.0003	3.62	0.0076
Nraizsec	120	0.34	0.7683	8.58	0.0005
Nraizsec	150	0.22	0.9044	7.26	0.0022
Nraizsec	180	7.98	<0.0094	8.42	0.0006
Nyemas	30	26.99	0.0130	---	---
Nyemas	60	38.35	0.0007	---	---
Nyemas	90	96.30	<0.0001	---	---
Nyemas	120	84.24	<0.0001	---	---
Nyemas	150	98.39	<0.0001	---	---
Nyemas	180	236.19	<0.0001	---	---

## Relaciones entre las características medidas

En la condición de invernadero, A los 30 días de desarrollo la longitud de raíz estuvo relacionada positivamente con la altura, el número de yemas y el área foliar, y esta última estuvo positivamente relacionada con el número de raíces secundarias. A los 60 días de desarrollo, la longitud de raíz estuvo relacionada positivamente con el número de raíces secundarias y el número de yemas, el número de raíces secundarias estuvo relacionado positivamente con la altura y con el área foliar y la altura estuvo relacionada positivamente con el número de yemas, es decir, a mayor longitud de raíz, las plantas presentaron un mayor número de raíces secundarias, fueron más grandes y tuvieron más área foliar y número de yemas (Cuadro 4). Lo que significa que a una mayor capacidad de asimilar nutrimentos, las plantas tuvieron mayores posibilidades de crecimiento y desarrollo.

**Cuadro 4.** Valores de correlación entre las características medidas para la condición de desarrollo de invernadero a los 30 (arriba de la diagonal) y los 60 (debajo de la diagonal) días de medición.

		longraiz	nraizsec	alt	nyemas	areafol	
60 días	longraiz	-		0.35336	0.36523	0.34806	30 días
				0.0006	0.0003	0.0007	
	nraizsec	0.20486	-			0.23021	
		0.057				0.0273	
	Alt		0.23291	-	0.18068		
			0.0299		0.0848		
	nyemas	0.37709		0.21263	-		
		0.0003		0.048			
	areafol		0.37109		0.2483	-	
			0.0004		0.0204		

A los 90 días de desarrollo el número de raíces secundarias se relacionó positivamente con la altura y el área foliar, ésta también se relacionó positivamente con el número de yemas, pero negativamente con el número de

hojas, esto implica un sacrificio en el número de hojas por parte de la planta, en la búsqueda de una mayor cantidad de área foliar que le permita mayor capacidad fotosintética; el número de yemas se relacionó positivamente con la longitud de raíz y la altura (Cuadro 5). A los 120 días se encontró una relación positiva entre el número de yemas y la longitud de raíz, la altura y el área foliar; ésta, como a los 90 días, presentó una relación negativa con el número de hojas (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Valores de correlación entre las características medidas para la condición de desarrollo de invernadero a los 90 (arriba de la diagonal) y los 120 (debajo de la diagonal) días de medición.

	longraiz	nraizsec	alt	nyemas	Nhojas	areafol	
120 días	longraiz	-		0.34733			90 días
				0.001			
	nraizsec		-	0.19426		0.26937	
				0.0714		0.0116	
	Alt			-	0.32279		
					0.0023		
	nyemas	0.33852		0.27157	-	0.34145	
	0.0013		0.0109		0.0012		
	nhojas				-	-0.25837	
						0.0157	
	areafol			0.24505	-0.29475	-	
				0.0222	0.0056		

A los 150 días la altura presentó una relación positiva con el número de yemas y el área foliar, pero negativa con el número de hojas; esta característica también estuvo negativamente relacionada con la longitud de raíz. Al parecer en este momento del desarrollo hay un equilibrio entre el crecimiento en altura y la búsqueda de mayor área foliar que permita mayor capacidad fotosintética y mayor absorción de nutrimentos, evitando la aparición excesiva de hojas que provoquen la pérdida de agua por evapotranspiración. A los 180 días la relación negativa entre raíces y área foliar continúa, esta vez con el número de raíces secundarias (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Valores de correlación entre las características medidas para la condición de desarrollo de invernadero a los 150 (arriba de la diagonal) y los 180 (debajo de la diagonal) días de medición.

		longraiz	nraizsec	nyemas	nhojas	areafol		
180 días	longraiz	-			-0.19492			150 días
					0.0704			
	alt		-	0.26465	-0.19737	0.60754		
	nraizsec			0.0132	0.0669	<0.0001		
	nyemas			-				
	areafol		-0.24772			-		
			0.0231					

En la condición de *in vitro*, a los 30 días de evaluación, hubo una relación positiva entre la altura y la longitud de raíz (Cuadro 7). A los 60 días de evaluación la relación entre el número de hojas y la longitud de raíz, así como la altura fue negativa; este comportamiento fue similar a lo ocurrido en la condición de invernadero, pero en una etapa más temprana (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Valores de correlación entre las características medidas para la condición de desarrollo de *in vitro* a los 30 (arriba de la diagonal) y los 60 (debajo de la diagonal) días de medición.

		longraiz	alt	nhojas		
60 días	longraiz	-	0.38748			30 días
			0.0022			
	nraizsec		-			
	nhojas	-0.30158	-0.40111	-		
			0.0192	0.0015		

A los 90 días la altura presentó una relación positiva con el número de raíces secundarias; pero una relación negativa entre con el número de hojas y éste con la longitud de la raíz (Cuadro 8). A los 120 días se encontró una relación positiva entre la altura con el número de raíces secundarias y la longitud de raíz; pero la relación entre esta característica y el número de hojas se mantiene negativo (Cuadro 8). Al parecer la búsqueda del equilibrio entre el crecimiento y la capacidad fotosintética se acentúa de manera temprana en la condición *in vitro*.

**Cuadro 8.** Valores de correlación entre las características medidas para la condición de desarrollo de *in vitro* a los 90 (arriba de la diagonal) y los 120 (debajo de la diagonal) días de medición.

		longraiz	nraizsec	alt	nhojas		
120 días	longraiz	-			-0.39919		90 días
					0.0016		
	nraizsec		-	0.33753			
				0.0084			
	alt	0.38498	0.31187	-	-0.46941		
		0.0024	0.0153		0.0002		
	nhojas	-0.27185			-		
		0.0356					

A los 150 días se encontró una relación positiva entre la longitud de raíz y el número de raíces secundarias, y entre esta característica y la altura; pero la relación entre la altura y el número de hojas, y entre este y la longitud de raíz, fueron negativas (Cuadro 9). A los 180 días se mantuvieron las mismas relaciones que se presentaron a los 150 días (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Valores de correlación entre las características medidas para la condición de desarrollo de *in vitro* a los 150 (arriba de la diagonal) y los 180 (debajo de la diagonal) días de medición.

		<b>longraiz</b>	<b>nraizsec</b>	<b>alt</b>	<b>nhojas</b>		
<b>180 días</b>	<b>longraiz</b>	-	0.33096		-0.26503		
			0.0098		0.0407		
	<b>nraizsec</b>	0.35507	-	0.36695			
		0.0054		0.0039			
	<b>alt</b>		0.39741	-	-0.40673		
		0.0017		0.0013			
	<b>nhojas</b>	-0.2676		-0.37605	-		
		0.0387		0.0031			

## DISCUSIÓN

El cirimo como es conocida en Michoacán, la especie *Tilia americana* var. *mexicana* Schlttdl.) J. W. Hardin, es un árbol con serios problemas de propagación, siendo totalmente evidente para este trabajo, como han disminuido drásticamente, el número de individuos, en cada población, hasta llegar a encontrar un solo individuo, en sitios donde se reportan poblaciones considerables, según Bello 1993.

Son pocos los estudios reportados a favor de su propagación ó conservación, aun estando categorizada en peligro de extinción (PE) (NOM-ECOL-059-2010) (SEMARNAT, 2010). Por lo anterior, el presente trabajo en específico este Capítulo III, ha utilizado dos metodologías, que se han trabajado muy poco, en cirimo, hasta donde las investigaciones reportan (Atrian - Mendoza, 2005) con el fin de evaluar el desarrollo inicial, en plantas germinadas de semillas de cirimo de cuatro arboles de Michoacán, obtenidas de la germinación de semillas en invernadero e *in vitro*.

La primera metodología utilizada para evaluar el desarrollo de las plántulas de Tilia, fue en invernadero, donde se tomaron mediciones de las variables propias del crecimiento y desarrollo vegetal, como son altura de tallo, número de hojas, número de yemas, área foliar, número de raíces secundarias y longitud de raíz. La comparación de estas variables, se realizó por edad (180 días), sitio de colecta (árbol 1 Ichaqueo, árbol 2 Paracho, árbol 3 Tancítaro y árbol 4 Tumbiscatío) y finalmente entre las dos metodologías (invernadero e *in vitro*).

En invernadero las plantas de Tumbiscatío (árbol 4) e Ichaqueo (árbol 1) mostraron en promedio un desarrollo mayor a los 180 días de edad, en la altura del tallo de 12.39 y 15.23 cm, área foliar 29.27 y 13.18 mm<sup>2</sup> y longitud de raíz de 9.50 y 10.50 cm, en comparación con Paracho (árbol 2) y Tancítaro (árbol 3), donde el desarrollo fue menor, pero mayor en número de hojas 7.87 y 6.68, aunque a partir de los 120 días, el número de hojas disminuyó en las plantas propagadas por semillas de los cuatro árboles, como respuesta, a la estación del año que transcurría en esas fechas (otoño). Lo anterior muestra como Tumbiscatío e Ichaqueo tiene un desarrollo mayor, posiblemente porque ambos individuos, comparten condiciones similares, en los sitios donde fueron colectados (INEGI, 2005; Clave geoestadística 16096, 2009). Lo mismo pasa con Paracho y Tancítaro, los cuales presentan menor crecimiento pero entre ambos sitios, el desarrollo de los individuos es similar.

En *in vitro*, aun estando restringido el desarrollo de las plántulas, por el tamaño del frasco se pudo observar que las plantas más altas, fueron las provenientes de Tumbiscatío seguidas por las de Ichaqueo con alturas de entre 1.43 y 3.07 cm; las plantas de Paracho (árbol 2) y Tancítaro (árbol 3) presentaron alturas de entre 0.68 y 1.94 cm entre los 30 y los 180 días de edad. En promedio, el número de hojas fue mayor en las plantas procedentes de semillas del árbol 2 y árbol 3, de 1.87 a 7.87 y menor en las procedentes del árbol 1 y del árbol 4 (1.87 a 7.07) en esta condición de desarrollo el número de hojas aumentó, conforme avanzó la edad de desarrollo. A diferencia de las hojas en plantas de invernadero, donde el

numero de hojas disminuyo a los 120 dias, ya que el otoño estaba comenzando. El número de raíces secundarias presentó los menores valores en las plantas procedentes de Paracho (de 1.13 a 5.53) y los mayores números se presentaron en las plantas procedentes de Ichaqueo y Tumbiscatío de 1.13 a 7.13 y en todas las plantas tendió a incrementarse con la edad. La longitud de la raíz se incrementó conforme avanzó la edad y varió de una localidad a otra, los menores valores se presentaron en las plantas procedentes de Paracho (árbol 2) y Tancítaro (árbol 3) de 0.30 a 1.40 cm y los mayores en las de las localidades de Ichaqueo (árbol 1) y Tumbiscatío (árbol 4) de 0.30 a 1.90 cm.

En condiciones de invernadero las plantas presentaron diferencias altamente significativas entre las localidades de colecta ( $P < 0.013$ ), durante todo el período de evaluación, en las características altura, área foliar, longitud de raíz y número de yemas. Del mismo modo en condición *in vitro* las plantas presentaron diferencias altamente significativas entre las localidades de colecta ( $P < 0.0012$ ), para altura y longitud de raíz. Lo cual indica que hay diferencia entre localidades respecto a su desarrollo ya sea en invernadero e *in vitro*. A diferencia de (Muñoz-Flores et al., 2011), donde no obtuvo diferencia significativa, entre tratamientos para propagar por enraizamiento de estacas a Tilia.

En el transcurso de los 180 días de medición, en las plantas de Tilia, se observo una relación positiva entre la mayoría de las variables (altura de tallo, número de hojas, número de yemas, área foliar, número de raíces secundarias y longitud de raíz) y en algunos casos negativa, para ambas condiciones (*in vitro* e invernadero). En invernadero, como se muestra en los resultados de este capítulo, las plantas entre más jóvenes presentan mayor relación entre los parámetros medidos, esto se aprecia, en la longitud de raíz, la cual presenta una relación positiva con el número de yemas y el área foliar, durante 30, 60, 90 y 120 días, esto se atribuye, a que las plantas en crecimiento, se mantienen en un balance entre el área de la superficie total disponible para asimilados (área foliar) y el área de la superficie disponible para la absorción de agua y minerales (área

radical) (Raven et al., 1999). Algo que menciona Raven et al., 1999, es que en plántulas, la superficie de absorción, excede ampliamente, la superficie sintetizadora; sin embargo, la relación raíz – área foliar, disminuye gradualmente con la edad de la planta. Para in vitro sucede algo totalmente distinto, ya que la longitud de raíz presenta una relación en su mayoría negativa con altura del tallo y el número de hojas, pero positiva respecto al número de raíces secundarias, esto se puede interpretar, debido a que las plantas en cultivo in vitro no necesitan, una superficie aérea considerable que provea asimilables, porque tienen suficientes nutrientes en el medio de cultivo.

De forma similar el aérea foliar, en invernadero, fue un parámetro que presentó una relación positiva, durante los 180 días, con el número de raíces secundarias, y a partir de los 90 días con el número de yemas y en algunos casos con la altura del tallo. Esta relación demuestra como el desarrollo de las partes radicales, repercute sobre las partes aéreas, en la mayoría de los casos para *Tilia*. Estas relaciones entre parámetros de crecimiento se presentan en una relación positiva, y en otros casos negativas, dependiendo de la etapa de desarrollo en la que se encuentre la planta y de las condiciones del medio en el que esté creciendo.

## CONCLUSIONES

El desarrollo inicial de *Tilia americana* var. *mexicana*, bajo condiciones de invernadero e *in vitro*, muestran en ambos casos, un mejor desarrollo las plantas de Tumbiscatio (árbol 4) e Ichaqueo (árbol 1), en la mayoría de las variables medidas. A diferencia de Paracho (árbol 2) y Tancítaro (árbol 3), donde se presentó un menor desarrollo. En condiciones de invernadero las plantas presentaron diferencias altamente significativas entre las localidades de colecta, durante todo el período de evaluación, al igual que las plantas de *in vitro*.

## LITERATURA CITADA

Bravo Marentes, C., A. M. López Gómez, 1999. Inventario de especies vegetales y animales de uso artesanal. *Biodiversitas*, **22**:9-14.

Fernández et., al. 1986. Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali Colombia. 34 p.

García-Magaña, J. J. 1994. Tratamientos pregerminativos para la propagación en vivero de *Tilia mexicana* Schltld. Instituto de Investigaciones forestales y Agropecuarias. Folleto técnico, 9 p.

SEMARNAT, 2010. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Protección ambiental - especies nativas de México de flora y fauna silvestre. Diario Oficial de la Federación, 30 de diciembre 2010, 77p.

Glenn R. Furnier. 2004. Métodos para Medir Variación Genética en las Plantas. Manejo de Recursos Genéticos Forestales, Segunda Edición. México D.F. 20 p.

Muñoz-Flores, H.J., G. Orozco-Gutiérrez, J.J. García-Magaña, V.M. Coria-Avalos, R. Salgado- Garciglia, M.R. Santiago-Santiago, 2011. Épocas de colecta y tratamientos para enraizamiento de estacas de cirimo *Tilia mexicana* Schlecht. (Tiliaceae). *Rev. Mex. Cien. For.*, **2**(3):13-24.

Raven, P.H., Evert, R.F. and Eichhorn, S.E. (1999). *Biology of Plants*. W.H. Freeman: Worth 6th ed. New York; ISBN:1-5725-9041-6

Rowe, D.B., F.A. Blazich, 2008. *Tilia* L., linden or basswood. En: The woody plant seed manual. Agr. (Bonner F.T., R.P. Karrfalt, eds.). U.S. Dept. Agr. For. Serv., Washington, D.C., *Hdbk 727*:1113-1118.

Will, A. 1989. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 31 p.

## CAPÍTULO IV

### MICROPROPAGACIÓN DEL CIRIMO (*Tilia americana* var. *mexicana*) (TILIACEAE) POR EL CULTIVO DE YEMAS AXILARES

#### RESUMEN

Para conseguir la micropropagación de *T. americana* var. *mexicana* (cirimo), yemas axilares de plántulas de 90 días de cultivo *in vitro* por la siembra de semillas colectadas del Árbol 1 (Ichaqueo, Morelia, Michoacán), fueron cultivadas en medio MS con diferentes concentraciones de auxina/citocinina (ANA/BA). El mayor número de brotes (7.75 brotes/explante) se logró con la adición de ANA (0.25 mg/L) en combinación con BA (1.0 mg/L) a los 60 días del cultivo. Los brotes regenerados fueron cultivados en MS con AIB, mostrando un 100% de enraizamiento con 5.0 mg/L de AIB, a los 45 días del cultivo. Las plántulas micropropagadas de *T. americana* var. *mexicana* de esta edad presentaron una altura de 4.51 cm con 3.3 raíces de 2.27 cm de longitud y fueron trasplantadas y aclimatadas en condiciones de cámara de crecimiento, para posteriormente ser cultivadas en invernadero. Después de 90 días de cultivo en invernadero, se observó un 70% de supervivencia. En los tratamientos óptimos tanto de brotación como de enraizado, se logró la micropropagación de plántulas de cirimo de otros tres Árboles colectados en Paracho, Tancítaro y Tumbiscatío, Michoacán, obteniendo la multiplicación de brotes, la regeneración de plántulas y su cultivo en invernadero, con resultados similares a los presentados en yemas axilares de plantas de cirimo del Árbol 1 (Ichaqueo).

#### INTRODUCCIÓN

En el Estado de Michoacán, México, las plantas de importancia forestal están seriamente amenazadas por la destrucción de bosques y selvas y por su explotación como fuente de madera para la elaboración de muebles, casas,

artesanías e instrumentos musicales, haciendo vulnerables a los recursos que aún prosperan en forma silvestre, de tal manera que están incluidas como plantas en riesgo de desaparición en la Norma Oficial Mexicana de Ecología (NOM-059-ECOL-2010) (SEMARNAT, 2010).

La especie *Tilia americana* var. *mexicana* Hardin [sinónimo: *Tilia mexicana* (Schltdl.)] conocida como cirimo en Michoacán, es uno de los árboles más apreciados por los artesanos, sobre todo por los guitarreros, fabricantes de máscaras, figuras y utensilios tallados a mano, reportada como fuente de madera para la elaboración de artesanías en el Inventario de especies vegetales y animales de uso artesanal realizado por CONABIO (Bravo-Marentes y López-Gómez, 1999). También hojas y flores son utilizadas por sus propiedades medicinales, la infusión de flores se usa como espasmolítico, sedante, males cardiacos y como remedio para la tos y el reumatismo (Niembro-Roca, 1986; Pavón y Rico-Gray, 2000; Pérez-Ortega *et al.*, 2008).

Desde la década de los 1980's, ha sido difícil conseguir su madera, por lo que muchos de los artículos que se fabrican exclusivamente de cirimo, se sustituyeron con los de pino, principalmente pino lacio (*P. michoacana* var. *cornuta*) (Guridi, 1980). Debido a la sobre explotación de este árbol, actualmente está catalogado como en peligro de extinción por la Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-2010, por lo que es urgente y necesaria su conservación.

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

través del enraizado de estacas de árboles adultos, aplicando ácido indolbutírico (AIB).

Con el cultivo de tejidos vegetales, utilizando partes aisladas de la planta (semillas, embriones, hojas, tallos, raíces, flores, frutos, anteras, microsporas, células, protoplastos, etc.), se puede obtener la clonación de árboles de importancia forestal con el fin de obtener su mejoramiento genético, propagación masiva o simplemente recuperarlo si éste se encuentra dentro de alguna categoría de extinción (Villalobos, 1990).

Estas metodologías no se han creado para reemplazar a las técnicas convencionales de selección, propagación y conservación de las especies vegetales, sino que son consideradas valiosas herramientas sobre todo en aquellas plantas con problemas de erosión genética y problemas de reproducción (pérdida de potencial germinativo y poca producción de semillas). Asimismo, con éstas es posible retardar el crecimiento, asegurar la sanidad y es un paso para la propagación masiva y mejoramiento genético, aún no explotados a gran escala, ya que no siempre resulta fácil establecer los cultivos *in vitro* y resulta costoso al inicio, debido principalmente a que cada especie tiene sus propios requerimientos específicos (Villalobos, 1990).

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

No hay reportes de un protocolo para la propagación *in vitro* de *T. americana* var. *mexicana*, por lo que la micropropagación es una técnica potencial de aplicarse a esta especie para conseguir su propagación masiva.

En la presente investigación se establecieron cultivos *in vitro* de *T. americana* var. *mexicana*, con el objetivo principal de establecer un método eficiente de micropropagación, determinando las condiciones óptimas de la regeneración de plántulas *in vitro* a partir de yemas axilares, vía la multiplicación de brotes y enraizamiento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Plántulas *in vitro***

El sistema de micropropagación (multiplicación de brotes y enraizado) fue establecido a partir de yemas axilares de plántulas *in vitro* germinadas de semillas de *T. mexicana* colectadas de un árbol en época de fructificación (mes de octubre) situado en la localidad de Ichaqueo, municipio de Morelia (Capítulo I). Una vez establecido el protocolo de micropropagación de *T. mexicana*, yemas axilares de plántulas *in vitro* de semillas de otros árboles (Árbol 2, Paracho; Árbol 3, Tancítaro; y Árbol 4, Tumbiscatío) (Capítulo I) fueron cultivadas en los tratamientos óptimos de brotación y enraizado.

### **Medios y condiciones de cultivo**

El medio nutritivo MS (Murashige y Skoog, 1962) fue utilizado para los estudios de regeneración *in vitro*, le fueron adicionados 30 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar, ajustando el pH a 5.7, con diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento. La multiplicación de brotes se evaluó en presencia de la combinación de ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA), el enraizamiento de brotes

en MS con ácido indolbutírico (AIB). Los frascos de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 20 minutos.

La inducción de brotes, enraizado y desarrollo de plántula se realizó en cuarto de cultivo con una intensidad de luz de 132  $\mu\text{E m/seg}^2$  y un fotoperíodo de 16 horas luz, así como una temperatura de 25°C.

### **Multiplicación de brotes**

Como explantes fueron utilizadas yemas axilares de plántulas germinadas *in vitro* de 60 días de cultivo, cultivándolas en MS con 11 tratamientos en combinaciones de ANA y BA con diferentes concentraciones como se especifica en el cuadro 1. Se cultivó un nudo por frasco de cultivo, de 0.5 cm de longitud conteniendo dos yemas axilares, realizando 10 repeticiones. Cada 15 días se determinó el porcentaje de brotación (número de explantes con brote/100), el número de brotes por explante y el tamaño de los mismos (cm).

**Cuadro 1.** Tratamientos pre-germinativos (escarificación) en semillas de *Tilia americana* var. *mexicana* para la germinación *in vitro*.

TRATAMIENTO	ANA (mg/L)	BA (mg/L)
TB0 (control)	0	0
TB1	0.1	0.1
TB2	0.1	0.25
TB3	0.1	0.5
TB4	0.1	1.0
TB5	0.25	0.25
TB6	0.25	0.5
TB7	0.25	1.0
TB8	0.5	0.5
TB9	0.5	1.0
TB10	1.0	1.0

## **Enraizado de brotes y desarrollo de plántulas**

Los brotes regenerados fueron separados y se cultivaron 3 por cada frasco de cultivo con medio MS y diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (AIB) (0, 1, 2.5, 5 y 10 mg/L), para inducir la formación de raíces y lograr la regeneración de plántulas, se emplearon 10 repeticiones. El seguimiento de la respuesta de inducción de raíz y el desarrollo de plantas regeneradas se realizó cada 15 días. Se determinó el porcentaje de enraizamiento, número de raíces y el tamaño de éstas, altura de la plántula y número de nudos.

## **Trasplante y aclimatación**

Las plántulas micropropagadas se mantuvieron bajo cultivo *in vitro* por 90 días para conseguir plántulas aptas para el trasplante y aclimatación, para hacer posible su cultivo en invernadero. El trasplante de 50 plantas se llevó a cabo usando como sustrato una mezcla de turba-agrolita (proporción 1:1). La aclimatación se realizó poniendo las plantas bajo condiciones de alta humedad relativa, la cual gradualmente fue disminuida hasta un 70%, para finalmente cultivarlas bajo condiciones de invernadero. Se determinó el porcentaje de supervivencia a los 90 días de su cultivo en invernadero.

## **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis estadístico por ANOVA en una vía y la prueba de Tukey para la separación de las medias de los tratamientos. Para el análisis estadístico, los valores expresados como porcentaje fueron transformados por la función arcoseno. El nivel de significancia para todas las pruebas estadísticas se fijó al 5%. Se utilizó el paquete estadístico SPSS de Windows (9.0). Los datos se presentan como la media más el error estándar.

## RESULTADOS

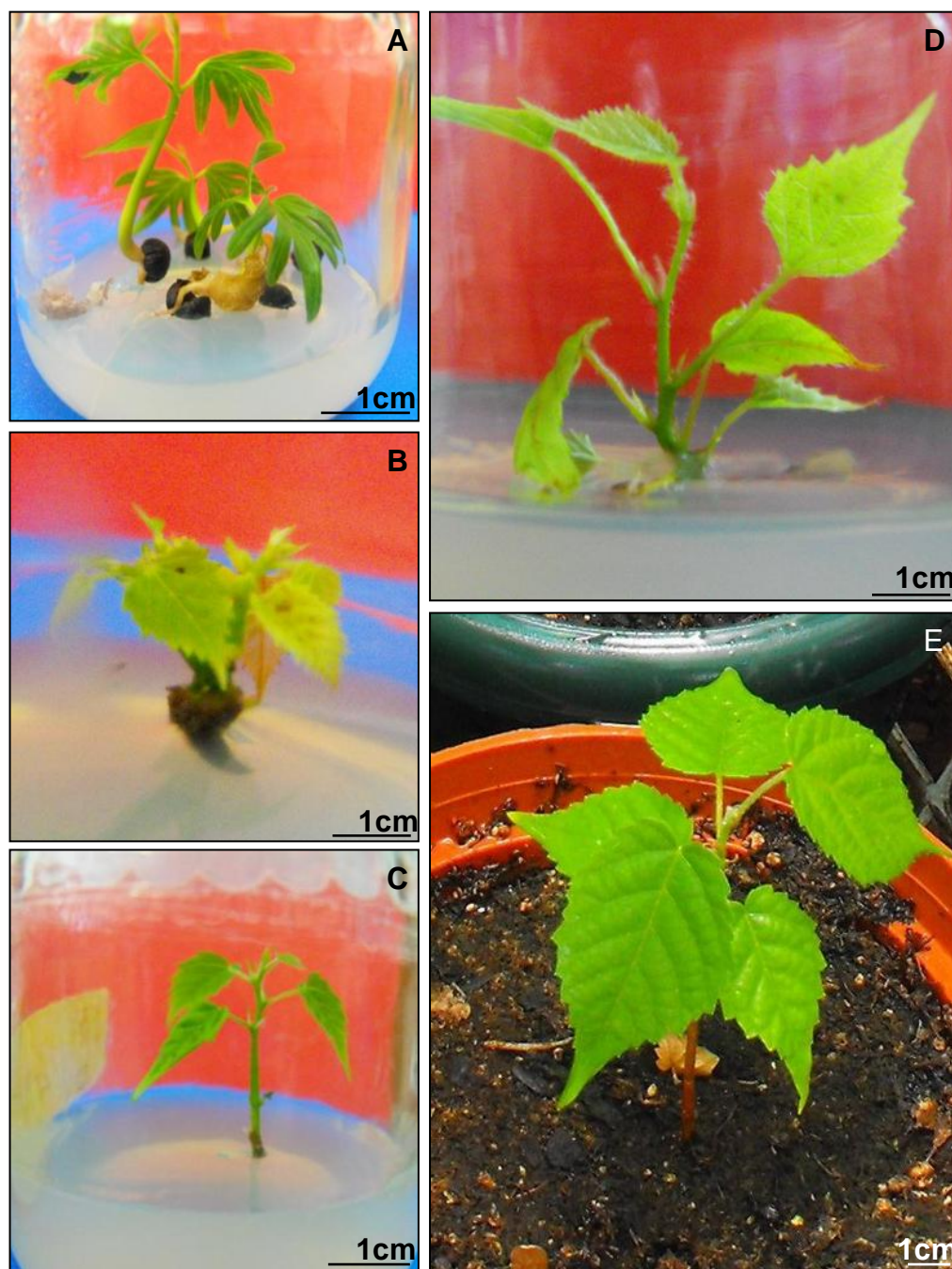
En la figura 1A se muestra una plántula de 90 días de cultivo *in vitro* posterior a la germinación, éstas mostraron una altura promedio de 4.57 cm, con la aparición de hojas verdaderas y de 2 a 3 raíces de hasta 1.25 cm de longitud. Éstas fueron fuente de explantes para la siembra de yemas axilares y lograr la multiplicación de brotes en medio con reguladores de crecimiento.

### **Multiplicación de brotes**

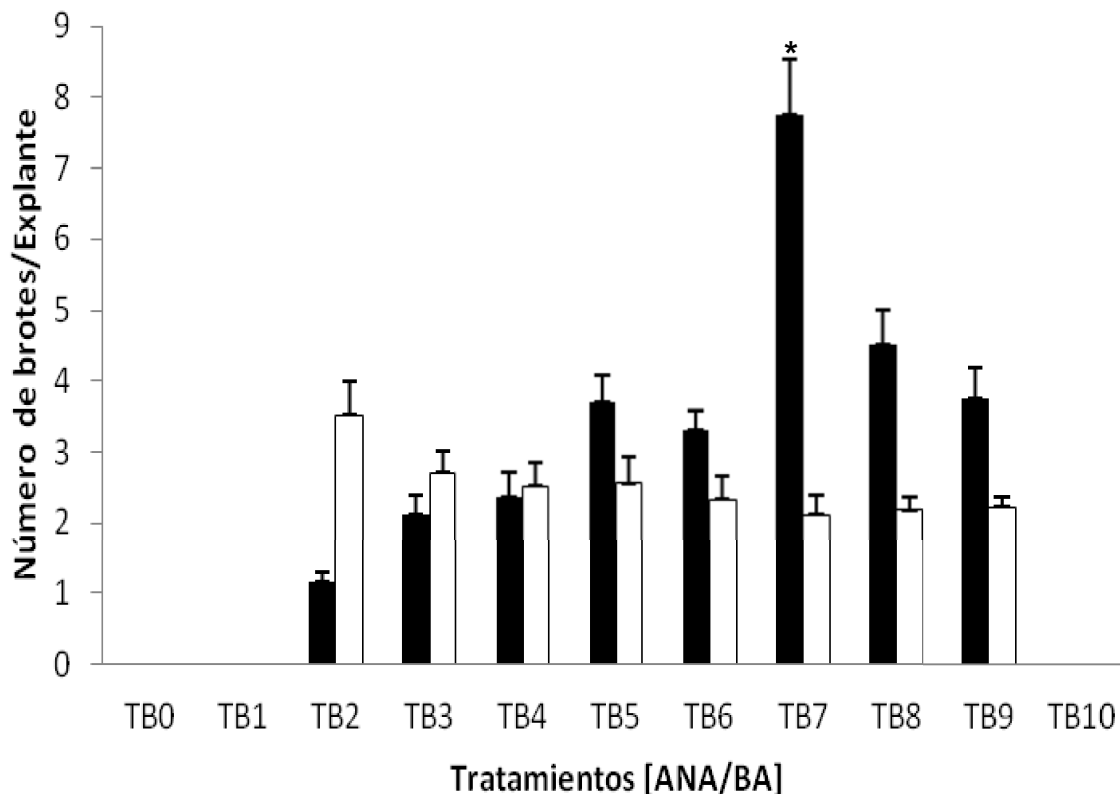
La respuesta de brotación múltiple fue muy variada, se observó una respuesta negativa a la formación de brotes en algunos tratamientos, con crecimiento del ápice (elongación) y un número de brotes entre 1.17 y 7.75 dependiendo de las dosis de los reguladores de crecimiento (Figura 2). Los explantes cultivados en MS con 0.25 mg/L de ANA y 1.0 mg/L de BA (TB7) produjeron 7.75 brotes en un período de 60 días, valor máximo obtenido entre todos los tratamientos (Figura 1B). Otros tratamientos con mejores resultados de multiplicación de brotes fueron aquellos donde se logró un promedio de 4.52 y 3.75 brotes por yema, como el TB8 y TB9, respectivamente. Se encontró una diferencia significativa en el número de brotes por explante del tratamiento TB7 en relación a los demás (Figura 2). El porcentaje de brotación fue de un 90% en todos los tratamientos que respondieron a la formación de brotes.

En los tratamientos TB0 y TB1, los explantes no respondieron a la inducción de brotes, los cultivados en TB0 (sin reguladores de crecimiento) permanecieron viables con un ligero desarrollo de las yemas. Sin embargo, en los cultivados en TB1 (0.1 mg/L de ANA y 0.1 mg/L de BA) se presentó la elongación del tallo, alcanzando una altura de hasta 4.53 cm a los 30 días del cultivo. En los explantes del tratamiento TB10, se desarrolló la formación de callo lignificado, sin desarrollo de brotes. Los brotes de mayor tamaño fueron los regenerados en el tratamiento

TB2, con 3.53 cm, seguidos por los del tratamiento TB3 y TB5, con brotes de 2.71 y 2.51 cm de altura, respectivamente (Figura 1B). Los brotes del tratamiento con mejor respuesta en brotación (TB7), alcanzaron una altura promedio de 2.11 cm.



**Figura 1.** Micropropagación de *Tilia americana* var. *mexicana* por cultivo de yemas axilares: A) Plántula germinada *in vitro* (90 días de cultivo); B) Multiplicación de brotes en yema axilar (60 días de cultivo); C) Brote micropropagado sometido a enraizamiento; D) Plántulas micropropagadas de 45 días; E) Plántulas de 90 días cultivadas en invernadero.



**Figura 2.** Influencia de ANA/BA en la multiplicación *in vitro* de brotes en yemas axilares de *Tilia mexicana*: Número de brotes (■); Longitud de brotes (□). Datos representan el promedio  $\pm$  error estándar. A los 60 días de cultivo. \*Diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ), de acuerdo a prueba de Tukey.

### Enraizamiento y desarrollo de plántulas

Los brotes micropropagados fueron cultivados en MS con las diferentes concentraciones de AIB para estimular la proliferación de raíces (Figura 1C). Desde los 15 días del cultivo una gran parte de los explantes (80%) formaron raíces, el número y tamaño de ellas dependió de la concentración del AIB. A los 45 días del cultivo, solo los brotes cultivados en MS con 5.0 mg/L de AIB mostraron un 100% de enraizamiento, las plántulas resultantes lograron una altura de 4.51 cm con 3.3 raíces de 2.27 cm de longitud, las de mejor crecimiento (Figura 1D). En los tratamientos con baja concentración de AIB (0 y 0.1 mg/L) no

se estimuló la formación de raíces, en los demás tratamientos, aunque hubo la formación de raíces, la respuesta varió en cuanto al número de raíces, su tamaño y la altura de las plántulas (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Influencia del ácido indolbutírico (AIB) sobre el número y tamaño de raíces en brotes micropropagados de *Tilia mexicana*. A los 45 días del cultivo.

AIB [mg/L]	Porcentaje de Enraizado	Número de Raíces/Explante	Tamaño de Raíces (cm)	Altura de Plántula (cm)
0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0
1.0	12	1.71 ± 0.134	1.11 ± 0.087	3.33± 0.427
2.5	33	2.1 ± 0.199	1.74 ± 0.117	3.72± 0.433
5.0	100*	3.3 ± 0.215 *	2.27 ± 0.167 *	4.51± 0.111 *
10.0	14	1.21 ± 0.124	0.77 ± 0.064	1.39± 0.217

\*Diferencia significativa con un valor de  $p \leq 0.05$  de acuerdo a la prueba de Tukey.

Para determinar la respuesta morfológica *in vitro* en explantes de plántulas de los otros tres sitios de colecta (Paracho, Tancítaro y Tumbiscatío), yemas apicales de éstas fueron cultivadas en el medio TB7 (MS con 0.25 mg/L de ANA y 1.0 mg/L de BA), cuantificando el porcentaje de brotación y el número de brotes a los 60 días de cultivo. Posteriormente, los brotes micropropagados fueron cultivados en el medio inductor de raíces MS con 5 mg/L de AIB, obteniendo el porcentaje de enraizado y número de raíces por brote, a los 45 días de cultivo (Cuadro 3).

Los porcentajes tanto de brotación como de enraizado, así como el número de brotes y de raíces no mostraron diferencias estadísticas en relación a lo obtenido en explantes de plántulas de Ichaqueo y entre los demás sitios de colecta (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Respuesta *in vitro* en yemas axilares de plántulas de *Tilia americana* var. *mexicana* de semillas de tres árboles, a los 60 días del cultivo.

Sitio de Colecta	Brotación (%)	Número de Brotes/Explante	Enraizado (%)	Número de Raíces/Explante
Árbol 2	92	7.1 ± 2.1	98	2.9 ± 0.71
Árbol 3	90	6.88 ± 1.9	97	3.1 ± 0.26
Árbol 4	94	7.8 ± 2.3	100	3.0 ± 0.18

### Trasplante y aclimatación

Las plántulas desarrolladas en el tratamiento con 5.0 mg/L de AIB fueron cultivadas bajo alta humedad relativa por 4 semanas y posteriormente en invernadero por 90 días. A este tiempo, las plántulas alcanzaron una altura de 11.5 cm con hojas y raíces bien desarrolladas, mostrando una supervivencia del 70% (Figura 1E).

### DISCUSIÓN

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

Este trabajo constituye un avance para el establecimiento de cultivos *in vitro* de yemas axilares de *T. mexicana*, con este método pueden cultivarse yemas de plantas de semillas provenientes de diferentes individuos y diversas localidades, esto con el fin de tener una variabilidad genética y conseguir su propagación con propósitos de repoblación o conservación.

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

El efecto observado por la dosis de BA en la brotación de yemas axilares y apicales de *T. mexicana*, ha sido reportado por varios investigadores, aunque en especies leñosas se describe el uso de concentraciones más altas (Saborio *et al.*, 1997) o más bajas de este regulador de crecimiento (Vidales *et al.*, 2001). Los resultados de esta investigación coinciden con los de Puddephat y colaboradores (1997), donde con 1 mg/L de BA se consiguen óptimos resultados de brotación en *Quercus robur* L.

En la prueba anterior también se observó que cuando no se utilizan reguladores de crecimiento se obtiene una buena longitud del brote, pero sin que éste se multiplique, en algunas especies esta etapa es necesaria para desarrollar el brote, antes de la inducción de raíces o de la aclimatación. Lo antes mencionado coincide con Von Arnold (1988) quien señala que frecuentemente es necesario eliminar las citocininas para el alargamiento y el enraizamiento de los brotes.

En segmentos nodales de plántulas germinadas *in vitro* de *Tilia platyphyllos*, la adición de una concentración baja de BA (0.6 mg/L) resultó en la máxima producción de brotes, aunque solo se obtuvieron 3.3 brotes/explantes (Chalupa, 2003). En explantes tanto de *T. cordata* como de *T. amurensis*, se han reportado dosis efectivas de 1.0 a 5.0 mg/L de BA para la multiplicación de brotes, con un número de brotes entre 3 y 5 brotes/explante (Chalupa, 1984; Youn *et al.*, 1989). Youn *et al.* (1988) sugiere que para conseguir la multiplicación de brotes en yemas de plantas adultas de *Tilia* spp, deben de adicionarse concentraciones más altas de BA (1.0 a 5.0 mg/L). El número de brotes regenerados *in vitro* de estas especies de *Tilia*, es un número inferior a lo encontrado en yemas axilares de *T. mexicana*.

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

La multiplicación de brotes, el enraizado de éstos y la supervivencia de plántulas durante la aclimatación en invernadero, mostró resultados similares entre los explantes provenientes de plántulas de cirimo de semillas colectadas de cuatro árboles, lo que indica que la respuesta morfogénica *in vitro* no es dependiente de la procedencia de la semilla.

## CONCLUSIONES

La adición de benciladenina (1.0 mg/L) en combinación con el ácido naftalenacético (0.25 mg/L) fue determinante para promover la máxima respuesta de multiplicación de brotes en yemas axilares, con 7.75 brotes/explante. Las plántulas micropropagadas presentaron un desarrollo de hasta 4.51 cm de altura, así como un óptimo enraizamiento, al cultivarse por 90 días en 5.0 mg/L de AIB, lo que permitió su cultivo en invernadero.

## LITERATURA CITADA

Bravo Marentes, C., A. M. López Gómez, 1999. Inventario de especies vegetales y animales de uso artesanal. *Biodiversitas*, **22**:9-14.

Chalupa, V., 1984. *In vitro* propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.), *Biol. Plant.*, **26**(5):374-377.

Chalupa, V., 1987. Effect of benzylaminopurine and thidiazuron on *in vitro* shoot proliferation of *Tilia cordata* Mill., *Sorbus aucuparia* L. and *Robinia pseudoacacia* L. *Biol. Plant.*, **29**:425-429.

Chalupa, V., 1990. Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.). *Plant Cell Reports*, **9**(7): 398–401.

Chalupa, V., 2003. *In vitro* propagation of *Tilia platyphyllos* by axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis. *J. Forest Sci.*, **49**(12):537-543.

García-Magaña, J.J., 1994. Tratamientos pre germinativos para la propagación en vivero *Tilia mexicana* Schlecht.. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. INIFAP. CIRPAC. *Boletín Técnico*, **27**:3-6.

Muñoz-Flores, H.J., G. Orozco-Gutiérrez, J.J. García-Magaña, V.M. Coria-Avalos, R. Salgado- Garciglia, M.R. Santiago-Santiago, 2011. Épocas de colecta y tratamientos para enraizamiento de estacas de cirimo *Tilia mexicana* Schlecht. (Tiliaceae). *Rev. Mex. Cien. For.*, **2**(3):13-24.

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

Niembro-Roca, A. 1986. Árboles y Arbustos Útiles de México. Naturales e Introducidos. UACH-LIMUSA. México, D.F., 206 p.

Pavón, N.P., V. Rico-Gray, 2000. An endangered and potentially economic tree of Mexico: *Tilia mexicana* (Tiliaceae). *Economic Botany*, **54**:113-114).

Pérez-Ortega, G., P. Guevara-Fefer, M. Chávez, J. Herrera, A. Martínez, A.L. Martínez, M.E. González-Trujano, 2008. Sedative and anxiolytic efficacy of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences used traditionally by communities of State of Michoacan, Mexico. *J. Ethnopharmacol*, **116**:461–468.

Rowe, D.B., F.A. Blazich, 2008. *Tilia* L., linden or basswood. En: The woody plant seed manual. Agr. (Bonner F.T., R.P. Karrfalt, eds.). U.S. Dept. Agr. For. Serv., Washington, D.C., *Hdbk 727*:1113-1118.

SEMARNAT, 2010. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Protección ambiental - especies nativas de México de flora y fauna silvestre. Diario Oficial de la Federación, 30 de diciembre 2010, 77p.

Villalobos, A. V. M. 1990. Historia del Cultivo de Tejidos. Fundamentos Teórico – Prácticos del cultivo de Tejidos Vegetales ( Rosell C.H. y Villalobos A. V. M., Eds), FAO, 105: 3-7.

Villalobos, A.V.M. y Engelmann F. 1995. Ex situ conservation of plant germplasm using biotechnology. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 11:376-382.

Youn, Y., K. Ishii, A. Saito, K. Ohba, 1989. *In vitro* plantlet regeneration by bud culture and its multiplication in *Tilia amurensis* seedlings. *J. Jpn. For. Soc.*, 71(2):61-64.

## 7. DISCUSIÓN GENERAL

Como ya se ha mencionado, a lo largo de cada capítulo, *Tilia americana* var. *mexicana*, es una especie que necesita metodologías propositivas y efectivas, que permitan acciones a favor de su propagación y conservación, ya que es una especie que se encuentra, en peligro de extinción (NOM-ECOL-059-2010) (SEMARNAT, 2010). Y de la cual se conoce muy pocos trabajos. Por lo que este trabajo, pretende aportar metodologías lo eficaces, que permitan contribuir a la conservación de esta especie.

Aunque en el país, se encuentra *Tilia* registrada, en 14 estados aproximadamente, a Michoacán, se le adjudicaba una mayor distribución dentro de su territorio con 18 sitios de distribución entre municipios y localidades, para el año de 1993 (Bello, 1993), en la actualidad estos sitios se han mantenido, pero con poblaciones de 1 a 6 individuos, esto se ha podido constatar gracias a las colectas de semillas que se realizaron en el 2010, para la realización la presente investigación.

La caracterización de los sitios, se realizó solamente para Tumbiscatío, Ichaqueo, Paracho y Tancítaro, donde fueron colectaron las semillas de *Tilia*. Principalmente elegidos por la accesibilidad hacia los árboles. Lo cual permitió apreciar, las diferencias y similitudes en los diferentes ambientes, mostrando para Tumbiscatío e Ichaqueo, similitudes en sus sitios, por el tipo de suelo presente (luvisol), precipitación anual (1200 mm), clima (templado-subhúmedo) y vegetación (pino-encino). A demás de ciertas diferencias en la latitud, altitud, temperatura. Lo mismo sucede para Paracho y Tancítaro donde comparten ciertas similitudes, respecto al tipo de suelo (andosol), Temperaturas (12 °C y 18°C) y clima (templado-subhúmedo).

Es también importante mencionar, que en Tumbiscatío e Ichaqueo, se encontraron el mayor número de individuos 6 y 3 respectivamente, pero los cuales

estaban aislados, con cañadas o ríos de por medio, en cuanto a Paracho y Tancítaro, solo se encontró un individuo en el sitio. Lo cual refleja como en 17 años aproximadamente, si se parte del registro de Bello en 1993, a la colecta realizada para este trabajo, en el 2010, las poblaciones de *Tilia*, pasaron de ser muy considerables a prácticamente nulas. Mostrando suelos muy erosionados.

Lo anterior complico la colecta de semillas, ya que se pretendían coleccionar de diferentes individuos por población, pero como ya se menciona, solo había un ejemplar posible de coleccionar para cada sitio.

Una vez que se coleccionaron las semillas por individuo, se realizo una escarificación acida, para acelerar el proceso de germinación, bajo condición de invernadero e *in vitro*, en donde los tratamientos de siembra de 1, 3 y 5 semillas por frasco en cultivos *in vitro*, pudo observarse una relación directa entre el número de semillas y el porcentaje de germinación, ya que al sembrar una semilla por frasco, esta germinaba, en cambio al sembrar 3 o 5 semillas, se liberaba entre ellas ciertas sustancias que inhibían la germinación (Rowe y Bazich, 2008). Algo que no había sido reportado por Atrián - Mendoza (2005), quien trabajo también en la germinación *in vitro* de semillas de *Tilia*.

Independientemente del sitio de colecta, los porcentajes de germinación, siempre fueron más altos, que los logrados en condiciones de invernadero, donde el máximo porcentaje fue de 15.5%, 6%, 6% y 4% en semillas provenientes de Tumbiscatío, Ichaqueo, Paracho y Tancítaro, respectivamente, aunque es preciso aclarar, que la germinación en invernadero, se realizo con un solo tratamiento, que incluye, cinco semillas por maceta y de cual, se tomo los resultados preliminares, para probar tres tratamientos distintos en condición *in vitro*.

En invernadero, los porcentajes reportados por García-Magaña (1994) no concuerdan con los obtenidos en la presente investigación, quien consigue hasta un 50% de germinación en semilla de cirimo de reciente colecta, ya que las

semillas de mayor porcentaje fueron las del sitio de colecta de Tumbiscatío (15%) que correspondió a un porcentaje de germinación real del 2.86%. Sin embargo, Atrián-Mendoza (2005) obtuvo porcentajes de germinación del 10% en semilla de reciente colecta sembradas en invernadero, resultado más acorde a lo obtenido al sembrar las semillas de los diferentes sitios de colecta. Es evidente al comparar la germinación *in vitro* e invernadero, que la primera, es más rápida en tiempo, pues tan solo dura 30 días, la germinación de la semilla y se obtienen excelentes porcentajes de germinación, aunque se requerirían de más medio de cultivo, para germinar una semilla por frasco. En cambio, en la segunda, el tiempo de germinación es más prolongado aproximadamente 90 días, obteniendo muy bajos porcentajes de germinación, esto puede deberse, a que las semillas en invernadero, están en condiciones un poco más reales a las de su medio natural, a diferencia de la condición *in vitro*, donde todo está controlado (luz, temperatura, nutrientes, Ph, etc.) manteniéndolas en las mejores condiciones, para su germinación.

Una vez germinadas las semillas, de las cuatro sitios, con edades de aproximadamente 90 días (condición *in vitro* e invernadero), se trasplantaron en frascos con nuevo medio de cultivo y macetas más grandes, respectivamente, con el fin de evaluar el desarrollo de las plantas, por sitio de colecta, edad y condición. Observando en las plantas de invernadero diferencias significativas entre sitios de colecta, al igual que las de *in vitro*, mostrando Tumbiscatío e Ichaqueo el mejor desarrollo respecto a Paracho y Tancítaro, los cuales hasta cierto punto guardan similitudes en su desarrollo *in vitro* e invernadero.

Hasta la fecha no habido reportes, de un protocolo para la propagación *in vitro* de *T. americana* var. *mexicana*, por lo que se probó, como parte final de esta investigación, una técnica muy efectiva, conocida como micropropagación, cultivando yemas de plantas de semillas, de cada una de las cuatro localidades, esto con el fin de tener una variabilidad genética y conseguir su propagación o conservación. En la etapa de regeneración de brotes en yemas se determinaron

las condiciones óptimas de la regeneración de plántulas *in vitro* a partir de yemas axilares, a través de la multiplicación de brotes y enraizamiento. En donde la adición de benciladenina (1.0 mg/L) en combinación con el ácido naftalenacético (0.25 mg/L) fue determinante para promover la máxima respuesta de multiplicación de brotes en yemas axilares, con 7.75 brotes/explante. Las plántulas micropropagadas presentaron un desarrollo de hasta 4.51 cm de altura, así como un óptimo enraizamiento, al cultivarse por 90 días en 5.0 mg/L de AIB, lo que permitió su cultivo en invernadero.

## 8. CONCLUSIONES GENERALES

Debido a que *Tilia americana* var. *mexicana* es una especie en peligro de extinción, para este trabajo, se plantearon objetivos que puedan aportar, alternativas a su conservación, evaluando el crecimiento y desarrollo de plantas propagadas *in vitro* e invernadero, donde se puede apreciar claramente que la germinación *in vitro*, permite germinar el mayor porcentaje de semillas, en el menor tiempo.

En cuanto al desarrollo de las plantas de *Tilia* en invernadero e *in vitro*, estas presentan hasta cierto punto un desarrollo similar, aunque en *in vitro* es más acelerado, mostrando durante el desarrollo, altas correlaciones entre características radicales y aéreas.

Una vez observado y analizado la información obtenida, en el desarrollo de las plantas, propagadas por semilla *in vitro*, se estableció un método de micropropagación, donde se obtuvieron mayor número de brotes, con la combinación de citocina BA con auxina ANA, y hasta un 80% de proliferación de raíces con AIB, finalmente este método permitió obtener hasta un 70% de supervivencia en la etapa de trasplante y aclimatación.

## 9. LITERATURA ADICIONAL

Abdul-Baki, A. A. y Anderson J.D.1972. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: Koslowsky T.T. (ed). Seed Biology. Vol II. Academic Press, New York. U.S.A. p. 283-316.

Agwah, E.M.R., Shehata S.A. y El-Sayed S.F.1994. Effect of some growth regulators on seed production of onion (*Allium cepa* L.). In: Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cairo., 45: 2, 469-482p.

Anderson, J. D.1973. Physiological and biochemical differences in deteriorating barley sedes. Crop. Sci.10(1)36-39.U.S.A.

Atrián, M.E. 2005. Establecimiento de un sistema de regeneración *in vitro* de *Tilia mexicana* Schldl. (Tiliaceae). Tesis de Licenciatura, Fac. de Biología, UMSNH.

Becwar, M R. 1988. Development and characterization of *in vitro* embryogenic systems in conifers. En Somatic cell genetics of woody plants (Ahuja M. R., Ed.), p. 37.

Begon, M. y Mortimer, M. 1986. Population Ecology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K. p. 117.

Bello, G. M. A. 1993. Plantas útiles no maderables de la Sierra Purépecha, Michoacán, México, INIFAP. México. Folleto Técnico No 10. 115 p.

Bidwell, R.G. 1996. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. 8ª reimpresión. Ed. Trillas. México. p. 461-463.

Bravo-Marentes, C. y López-Gómez A.M. 2002. Inventario de especies vegetales y animales de uso artesanal (Asoc. Mex. de arte y cultura popular A.C.), CONABIO, Biodiversitas No. 22.

Buddenford-Joosten, J.M.C. y Woltering E.J. 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. Plant Growth Reg. 15: 1-16.

Burdon, R. D. 1994. The role of biotechnology in forest tree breeding. Forest Genetic Resources 22: 2-5.

Burdon, R. D. 1999. Risk-management issues for genetically engineered forest trees. New Zealand Journal of Forest Research, 29: 375-390.

Caballero, J. 1990. El uso de la diversidad vegetal en México: tendencias y perspectivas. En: Medio ambiente y desarrollo en México (E. Leff, Ed.) Vol.1. Miguel Ángel Porrúa Editores, México. pp. 257-298.

Cardoso, M. A., Provan J., Powell W., Ferreria P.C.G. y Oliverira D.E. 1998. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae Caesalpinioideae). Molecular Ecology 7: 601-608.

Carabias, J. 1994. Manejo de recursos naturales y pobreza rural. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica; México. Capítulo 1. pp. 15-36.

Colmenero-Robles, Fernández-Nava R. y Rodríguez-Jiménez, C. 2003. La Familia Tiliaceae en la Cuenca del Río Balsas, México. XV Cobgreso Mexicano de Botánica. Soc. Bot. de México.

Cronquist, A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. The New York Botanical Garden, Nueva York, EUA, 1262 p.

Diario Oficial de la Federación. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Segunda Sección. Secretaría de medio ambiente y recursos naturales. pp. 95-190.

Flores-Villela, O. y Geréz P. 1988. Biodiversidad y conservación en México: Vertebrados, vegetación y uso de suelo. CONABIO y Universidad Nacional Autónoma de México, México.

García-Magaña, J. J. 1994. Tratamientos pregerminativos para la propagación en vivero de *Tilia mexicana* Schltld. Instituto de Investigaciones forestales y Agropecuarias. Folleto técnico, 9 p.

Gómez-Pompa, A. y Dirzo R. 1998. Las reservas de la biosfera y otras áreas naturales protegidas de México. Publication of the Secretary of the Environment, Natural Resources and Fisheries of Mexico (SEMARNAP) and The Commission for Biodiversity of Mexico (CONABIO). México. 159 pp.

Guridi, G. L. I. 1980. La madera en las artesanías del Estado de Michoacán. Instituto de Investigaciones Forestales, México. Boletín Divulgativo. No. 50. SARH/INIF. 129 p.

Hartmann, T. H., Kester E. y Davies F.T. 1997. *Plant Propagation: principles and practices: Sixth edition*. Prentice Hall. New Jersey, USA pp. 124.

López, P.C. 1990. Medios de cultivo. En: *Fundamentos Teórico – Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales*. (Cadmó H. R. y Villalobos A.V.M., Eds.). FAO. Roma. pp. 15-19.

Martínez, S. M. 1987. Plantas autóctonas y productos volcánicos de las inmediaciones de Morelia. Biblioteca de Científicos Nicolaitas No. 10. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Miranda, F. 1984 a. Madurez fisiológica de semillas. VIII curso de postgrado de tecnología de semillas. CIAT Cali, Colombia. p.33.

Murashige, T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*. 15:473-497.

Niembro-Roca, A. 1986. Árboles y Arbustos Útiles de México. Naturales e Introducidos. UACH-LIMUSA. México, D. F.

Muñoz-Flores, H.J., G. Orozco-Gutiérrez, J.J. García-Magaña, V.M. Coria-Avalos, R. Salgado- Garciglia, M.R. Santiago-Santiago, 2011. Épocas de colecta y tratamientos para enraizamiento de estacas de cirimo *Tilia mexicana* Schlecht. (Tiliaceae). *Rev. Mex. Cien. For.*, 2(3):13-24.

Orea, D. Y Villalobos V. 1990. Micropropagación de especies forestales. En fundamentos teóricos-prácticos del cultivo de Tejidos Vegetales. Estudio FAO. Producción y protección vegetal, Roma, Italia.

Pavón, N.P., V. Rico-Gray, 2000. An endangered and potentially economic tree of Mexico: *Tilia mexicana* (Tiliaceae). *Economic Botany*, 54:113-114).

Pérez-Molphe, B.E.M., Ramírez M.R., Núñez P.H.G. y Ochoa A.N. 1999. Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales para la conservación de germoplasma. En: Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. FOMES 97-1-5. pp. 129-134.

Pérez-Ponce, J. N. 1998. Propagación y Mejoramiento Genético de Plantas por Biotecnología de las Plantas. 5to. Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Libro de reportes. Santa Clara, Cuba. pp. 25-31.

Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-prensa. Madrid, España. pp. 149-167.

Rojas-Alba, M. 1996. Introducción al estudio del uso tradicional y popular de las plantas medicinales en México. Tlahui-Medic. No. 1.

Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Editorial Limusa, México. 432 p.

Rzedowski, J. 1981. Vegetación de México. Editorial Limusa. México. Vegetación de México. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Tercera reimpresión. Editorial Limusa, México, 430 p.

Salgado-Garciglia R, Díaz D. y Espinoza J.C. 1997. Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales y su aplicación biotecnológica. Ciencia Nicolaita UMSNH 14:1-11.

Salgado-Garciglia R. 1999. Cultivo de tejidos vegetales: Micropropagación. Manual de Notas Curso-Taller de Micropropagación. Fac. de Biología UMSNH. pp. 98.

SEMARNAT/PROCYMAF, 2000. Proyecto de Conservación y Manejo Sustentable de Recursos Forestales en México (PROCYMAF). Balance de tres años de ejecución. 29 pp.

Soto, N. J. C. 1987. Las plantas medicinales y su uso tradicional en la cuenca del Río Balsas; Estado de Michoacán y Guerrero, México. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.

Sparks, D. L.. 2000. Advances in agronomy. Department of Plant and Soil Sciences. University of Delaware Network, Delaware. Volume 68 Academic Press.

Standley P., C. 1982. Trees and shrubs of Mexico. Contribution from the United States National Herbarium. Vol 23. Smithsonian Institution. United States National Museum. Washington, D.C. USA. 1721 p.

Toledo, V. M. 1998. La diversidad biológica de México. Ciencia y Desarrollo 14(81):17-30.

The New York Botanical Garden, 2004. International Plant Science Center, Virtual Herbarium, Vascular Plant Types Catalog, Tiliaceae, *Tilia*. <http://sciweb.nybg.org/science2/hcol/vasc/index.asp>.

Villalobos, A. V. M. 1990. Historia del Cultivo de Tejidos. Fundamentos Teórico – Prácticos del cultivo de Tejidos Vegetales ( Rosell C.H. y Villalobos A. V. M., Eds), FAO, 105: 3-7.

Villalobos, A.V.M. y Engelmann F. 1995. Ex situ conservation of plant germplasm using biotechnology. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 11:376-382.

Watson, L. y Dallwitz M.J. 1992. The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. Version: 14th December 2000. <http://biodiversity.uno.edu/delta/>

Weaver, R. J. 1996. Reguladores del crecimiento de las plantas de la agricultura. Trillas, México. P. 19-39, 81,113-155.

## 10. ANEXO ACUSE DE RECIBIDO DE PUBLICACIÓN

**POLIBOTÁNICA**

09. Agosto. 2012

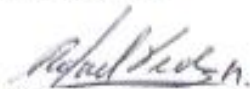
**WENDY ZURITA-VALENCIA**

Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Morelia, Michoacán, México

En relación a su manuscrito: “ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO EFICIENTE DE GERMINACIÓN *in vitro* Y MICROPROPAGACIÓN DEL CIRIMO (*Tilia mexicana* SCHLECHT.) (TILIACEAE)”, teniendo como co-autores a: J. ELMAR GÓMEZ-CRUZ, ESTEBAN ATRIÁN-MENDOZA, ALEJANDRA HERNÁNDEZ-GARCÍA, MARÍA ELENA GRANADOS-GARCÍA, J. JESÚS GARCÍA-MAGAÑA, RAFAEL SALGADO-GARCIGLIA y NAHUM M. SÁNCHEZ-VARGAS, le comentamos que lo hemos recibido para su potencial publicación en *POLIBOTÁNICA*. Nosotros esperamos tener la revisión, comentarios y/o sugerencias de dicho artículo en aproximadamente veinte semanas hábiles.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,



Dr. Rafael Fernández Nava,  
Editor en Jefe de *POLIBOTÁNICA*

*POLIBOTÁNICA*



IPN

---

Departamento de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas  
Instituto Politécnico Nacional, Apartado Postal 17-564, CP 11410, México, DF.