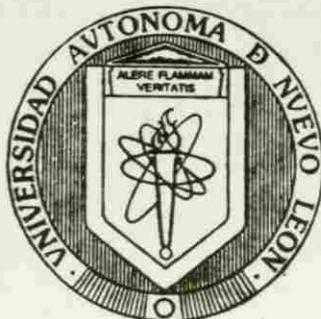


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



PROPAGACION *IN VITRO* Y POR ESTACAS DE TALLO DEL NIM

(*Azadirachta indica* A. JUSS)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS



UANL

ESPECIALISTA EN PRODUCCION AGRICOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PRESENTA

JORGE TORRES LEAL

MARIN, N. L.

JUNIO DE 1994



TM  
SB29  
N5  
T6  
c.1



1080063757



# UANL

---

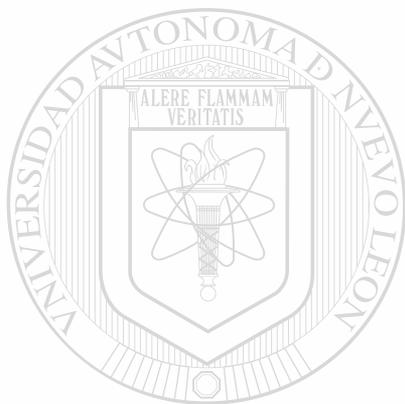
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PARA EL M.C. JOSÉ LUIS CONTRA G.  
POR APOYAR MIS ESTUDIOS DE  
POSTGRADO.

GRACIAS  
JORGE TORRES G.  
JUNO 1941



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

UANL

**PROPAGACION *in vitro* Y POR ESTACAS DE TALLO DEL NIM**

**(*Azadirachta indica* A. JUSS)**



**TESIS**

Sometida al comité particular como requisito parcial ~~para~~ ~~la~~ ~~obtención~~ ~~del~~ ~~grado~~ ~~de~~ ~~maestro~~ ~~en~~ ~~ciencias~~ ~~especialista~~ ~~en~~ ~~producción~~ ~~agrícola~~

para la obtención del grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**ESPECIALISTA EN PRODUCCION AGRICOLA**

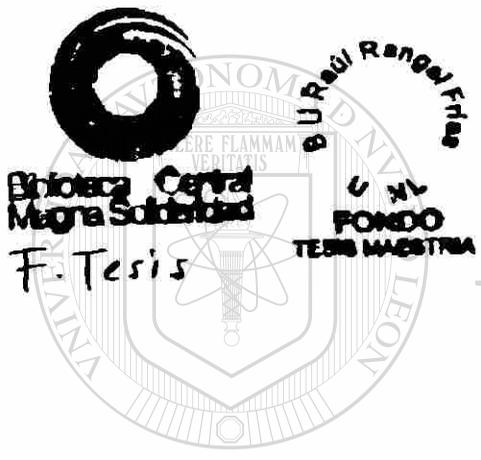
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Revisada y aprobada por el comité particular:

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1M  
B 92

045 1



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

## DEDICATORIA

### A MIS PADRES:

Sr. Ruperto Torres Verastegui  
Sra. Ma. de la Luz Leal de Torres

A quienes agradezco su cariño, sacrificio y comprensión al dirigir mi vida por el camino de la superación.

### A MI ESPOSA:

Sra. Ma. del Socorro Rodríguez de Torres.

Por su apoyo constante y por el estímulo que representa su presencia en mi vida.

### A MIS HIJOS:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Ivan Israel y Jonathan Omar

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por llenar mi vida de felicidad.

### A MIS HERMANOS:

Irma, Martha, Elsa, Susana, Laura, Dora y Armando.

Por la unión y armonía que han hecho posible prevalezca en el seno de nuestra familia.

A todos con respeto y amor.

## BIOGRAFIA

El autor nació en la ciudad de Monterrey, N. L. (México) el 12 de Diciembre de 1956. Entre 1963 y 1969 realizó sus estudios primarios en la escuela General Mariano Escobedo. Sus estudios secundarios los llevó a cabo de 1969 a 1972 en la secundaria Federal Reforma. Recibió el título de bachiller en el año de 1975 en la preparatoria de la Universidad Regiomontana. En 1976 ingresó a la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL) donde obtuvo el título de Ingeniero Agrónomo Fitotecnista en 1980. A partir del año de 1980 a la fecha se ha desempeñado como Maestro de Tiempo Completo de la FAUANL.



# UANL

---

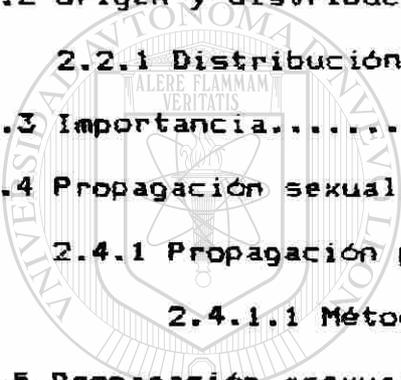
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

# INDICE

	Página
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS .....	iii
RESUMEN.....	vi
SUMMARY.....	viii
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1 Ubicación taxonómica y descripción botánica del nim.....	4
2.2 Origen y distribución.....	5
2.2.1 Distribución en México.....	5
2.3 Importancia.....	6
2.4 Propagación sexual de plantas.....	7
2.4.1 Propagación por semillas del nim.....	8
2.4.1.1 Método de cultivo.....	8
2.5 Propagación asexual de plantas.....	11
2.5.1 Estacas.....	11
2.5.1.1 Tipos de estacas.....	12
2.5.1.2 Factores que influyen en el enraizamiento de estacas.....	12
2.5.1.3 Tratamiento de estacas con reguladores de crecimiento.....	15
2.5.1.4 Medios para enraizamiento.....	15
2.5.2 Micropropagación.....	17
2.5.2.1 Embriogénesis somática.....	17
2.5.2.2 Organogénesis.....	19
2.5.2.3 Brotación axilar.....	20
2.5.2.4 Etapas de la micropropagación....	20
2.5.2.5 Ventajas de la micropropagación..	21



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



	Página
<b>III. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1 Localización.....	23
3.2 Materiales de laboratorio y campo.....	23
3.2.1 Equipo e instrumental.....	23
3.2.2 Material de cristalería.....	24
3.2.3 Compuestos químicos.....	24
3.2.4 Material de laboratorio diverso.....	25
3.2.5 Material de campo.....	25
3.3 Material vegetal.....	26
3.4 Medio de cultivo.....	26
3.5 Ambiente de cultivo.....	28
3.6 Establecimiento aséptico y brotación.....	29
3.7 Multiplicación.....	32
3.8 Enraizamiento.....	33
3.9 Morfogénesis.....	34
3.10 Propagación por estacas.....	36
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>38</b>
4.1 Establecimiento aséptico.....	38
4.2 Multiplicación.....	42
4.3 Enraizamiento.....	45
4.4 Morfogénesis.....	49
4.5 Propagación por estacas.....	52
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>59</b>
<b>VII. APENDICE.....</b>	<b>65</b>

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro	Título	Página
1-	Composición de la mezcla de sales inorgánicas MS (Sigma <sup>MR</sup> ).....	25
2-	Soluciones concentradas utilizadas en la preparación de los medios de cultivo en los experimentos de nim.	28
3-	Condiciones climáticas prevalecientes en el Campo Experimental de la FAUANL en Marín, N. L. durante 1992 y 1993.....	29
4-	Tratamientos de desinfección a base de diferentes concentraciones de Cloralex <sup>MR</sup> y tiempos de inmersión utilizados para el establecimiento aseptico de segmentos nodales de nim.....	30
5-	Concentraciones de las citocininas utilizadas en la evaluación de la multiplicación y crecimiento de yemas axilares de nim.....	33
6-	Tratamientos evaluados para la inducción de callos y regeneración de plantas a partir de diferentes explantes y reguladores del crecimiento.....	35

7-	Porcentajes de contaminación de segmentos nodales de nim al ser sometidos a varios tratamientos de desinfección en dos fechas de siembra.....	39
8-	Promedios de contaminación de segmentos nodales de nim establecidos en tres épocas, sometidos a diferentes concentraciones de Gloralex <sup>MR</sup> y tiempos de inmersión.....	40
9-	Análisis de varianza del porcentaje de contaminación de segmentos nodales de nim sometidos a diferentes tratamientos de desinfección	41
10-	Brotación y formación de callo de yemas axilares de nim en un medio con diferentes concentraciones de sacarosa.....	43
11-	Efectos de dos citocininas en la brotación y formación de callo de yemas axilares de nim.....	44
12-	Tamaño de brote, número de hojas y porcentaje de callo obtenidos en brotes axilares de nim, establecidos en medios sólidos y líquidos con diferentes auxinas.....	45
13-	Análisis de varianza para longitud de brotes de nim al emplear tres fitoreguladores, adicionados a medios sólidos y líquidos.....	47

Cuadro	Título	Página
14-	Cambios observados en los explantes de nim durante su morfogénesis....	50
15-	Porcentajes de brotación, enraizamiento y sobrevivencia de estacas de nim establecidas en tres épocas del año de 1993 en dos ambientes...	53
16-	Análisis de varianza y comparación de medias para porcentaje de brotación y enraizamiento de estacas de nim en invernadero y vivero.....	54
<b>Figuras del apéndice</b>		
1A	Ramas con hojas y frutos del nim...	66
2A	Distribución mundial del nim.....	67
3A	Distribución Nacional del nim.....	68
4A	Jabón y pasta dental fabricados a base de aceite del nim.....	69
<b>Cuadros del apéndice</b>		
1A	Significado de las abreviaturas utilizadas en el presente escrito..	70

## RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Vegetal, en el vivero y en el invernadero de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L., ubicados todos en Marín, N. L., México, de Abril de 1992 a Mayo de 1993.

El objetivo de ésta investigación fué establecer la técnica de micropropagación de *nim* mediante el estudio de algunos factores que determinan el establecimiento aséptico, brotación, multiplicación y enraizamiento a partir de yemas axilares, secciones de hoja, tallo y pecíolo. Por otro lado, también se comparó el efecto de tres fechas de colecta de estacas de tallo semileñosas en cuanto a su brotación y enraizamiento en el invernadero y en el vivero.

Para lograr lo anterior, se efectuaron cinco experimentos. El primero de ellos consistió en el establecimiento aséptico de segmentos nodales de *nim*, en el cual se probaron nueve tratamientos obtenidos por la combinación de la inmersión de los explantes durante 5, 10 ó 20 minutos en una solución de Cloralex<sup>MR</sup> al 5, 10 ó 20 % (v/v). El análisis de varianza detectó diferencias significativas entre las concentraciones de Cloralex<sup>MR</sup>, pero no entre los tiempos de inmersión ni entre las interacciones; sin embargo, los menores valores numéricos de contaminación se presentaron con 20% de Cloralex<sup>MR</sup> durante 5 minutos de inmersión ó más.

También se realizó un experimento para promover la multiplicación de yemas axilares, empleando la adición al medio de cultivo de diferentes concentraciones de sacarosa (10, 20, 30, 40 y 50  $gl^{-1}$ ), así como la adición de 6-BAP y KIN tanto solas como combinadas. En cuanto a la adición de sacarosa, el empleo de 10  $gl^{-1}$  fué la concentración que promovió más la brotación de yemas

axilares, mientras que con la adición de 0.5 , 1, 2.5 y 5  $\text{mg l}^{-1}$  de BAP y KIN se indujo brotación y formación de callo.

Posteriormente se evaluó la adición de 1  $\text{mg l}^{-1}$  de AIA, 1  $\text{mg l}^{-1}$  de ANA y además un tratamiento control sin reguladores del crecimiento. Se encontró que ninguno de los cuatro tratamientos anteriores fue capaz de promover la formación de raíces en dos estados físicos del medio (sólidos y líquidos).

Al probar secciones de hojas, peciolo y tallos como explantes en medios de cultivo con 0.5  $\text{mg l}^{-1}$  de 2,4-D + 0.05  $\text{mg l}^{-1}$  de BAP; 0.5  $\text{mg l}^{-1}$  de BAP+ 0.5  $\text{mg l}^{-1}$  de ANA y el tratamiento control, se encontró que los dos últimos tratamientos fueron inductores de morfogénesis de novo a los 105 días después de la transferencia, obteniéndose brotes de tallo y raíz en los explantes de hoja, previa formación de callo.

Finalmente al evaluar la respuesta a la brotación y enraizamiento de estacas de tallo semileñosas, cortadas en tres épocas diferentes del año y colocadas en dos ambientes de cultivo: vivero e invernadero, se encontró que al colectar durante el mes de Agosto, se tuvieron resultados sobresalientes en brotación, enraizamiento y sobrevivencia de las estacas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## SUMMARY

The present study was developed of Plant Biotechnology, the nursery and the greenhouse of the Facultad de Agronomía, UANL located in Marín, N.L. Mexico, from april 1992 to may 1993.

The objective was to establish the micropropagation technique for the neem tree by studying some factors that influence the aseptic establishment, growth bud, multiplication and rooting from axillary buds, and from leaf stem and petiole sections. Additionally, the effect of three dates of collection of stem cuttings on sprouting and rooting in the nursery and the greenhouse.

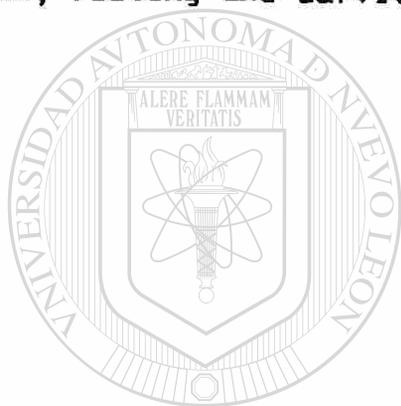
Five test were developed. The first consisted on the aseptic establishment of node segments of neem, testing nine treatments obtained from the combination of three immersion intervals (5, 10 and 20 min) and three Cloralex<sup>MR</sup> concentrations [5, 10 and 20% (v/v)]. The analysis of variance found significant differences between the Cloralex<sup>MR</sup> concentrations, but not between immersion intervals or interactions. The lower contamination occurred in the 20% concentration.

Another test developed to promote the multiplication of axillary buds, adding 10, 20, 30, 40 and 50  $g\ l^{-1}$  of sucrose to the culture medium, and adding 6-BAP and KIN along or combined. Ten  $g\ l^{-1}$  was the sucrose concentration that better promote axillary growth, while the addition of 0.5, 1.0, 2.5 and 5  $mg\ l^{-1}$  of BAP and KIN promote bud growth and callus formation.

Posteriorly, the addition of 1  $mg\ l^{-1}$  of IAA, 1  $mg\ l^{-1}$  of NAA and a control without growth regulators was evaluated. It was found that none of the three treatments had root formation in two physical states of the medium (solid and liquid).

When testing leaf, petiole and stem sections as explant in culture medium with  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  of 2,4-D +  $0.05 \text{ mg l}^{-1}$  BAP,  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  of NAA and a control, it was found that two last treatments promote *de novo* morphogenesis in 105 days after the transference obtaining growth of stem and root in leaf explants, after callus formation.

Finally, when evaluating the sprouting and rooting of stem cuttings collected in three different dates, and placed in two environments: nursery and greenhouse, it was found that the best growth, rooting and surviving was in the august collection.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## I. INTRODUCCION

El nim (*Azadirachta indica* A. Juss) es un árbol originario de la India y Birmania a partir de donde se ha distribuido a un gran número de países debido a su amplia adaptación y a sus cualidades y usos. Se le ha utilizado en la elaboración de jabón y pasta dental, también se ha aplicado al suelo como abono orgánico, es apreciado por su madera y se ha comprobado su efectividad para el control de un gran número de insectos plaga.

Tomando en consideración todo lo anterior, además de la alta toxicidad de los insecticidas sintéticos y sus efectos contaminantes al ambiente, el Dr. Josué Leos de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L. decidió introducir esta especie a México, y fue en 1989 cuando llegaron las primeras 700 semillas procedentes del Instituto Internacional de Investigación en Arroz (IRRI) en Filipinas, mismas que fueron sembradas en invernadero, y al cabo de un año se estableció un huerto en el Campo Agrícola Experimental ubicado en Marín, N. L. El resto de los árboles fueron distribuidos a lo largo de todo el país.

La propagación normal de la especie es por semillas, mismas que se obtienen de árboles de más de cinco años de edad. Debido a que los árboles existentes en México aún no reúnen estas características, y a que el proceso de importación de las semillas es lento y difícil, se ha estudiado la propagación asexual con poco éxito en el enraizamiento de estacas.

Desde la introducción de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales en México en 1970, se ha impulsado ampliamente sus aplicaciones prácticas en la agricultura, teniendo a la fecha una aceptación muy buena sobre todo en los casos de micropropagación de diferentes especies de importancia económica. Esta técnica reúne algunas ventajas adicionales con relación a la propagación convencional, ya que se requiere de muy poco espacio, la multiplicación es masiva y en menor tiempo, además de que la

propagación no está limitada por las condiciones ambientales.

Considerando el potencial de las técnicas de propagación asexual para la selección y conservación de germoplasma sobresaliente principalmente en adaptación y en contenido de los principios activos involucrados en el control de insectos plaga, se planteó el presente trabajo de investigación con los objetivos siguientes:

#### Generales:

##### A nivel laboratorio:

Desarrollar la técnica de micropropagación de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) mediante el estudio de algunos factores que determinan el establecimiento aseptico, brotación, multiplicación y enraizamiento de yemas axilares, secciones de hoja, tallo y peciolo.

##### A nivel de invernadero y vivero:

Evaluar la respuesta al enraizamiento y brotación de estacas semileñosas, colectadas en tres épocas del año.

Además se plantearon los siguientes objetivos específicos: <sup>®</sup>

##### Para la desinfección:

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Cloralex <sup>MR</sup> y de tiempos de inmersión, en la desinfección de segmentos nodales, secciones de hoja, tallo y peciolo de nim en dos épocas del año.

##### Para el medio de cultivo:

Establecer la mejor concentración de sacarosa necesaria para una buena brotación de yemas axilares.

Evaluar la adición de dos citocininas: la 6- bencilaminopurina (BAP) y la Cinetina (KIN) tanto solas como combinadas para la formación de brotes en yemas axilares.

Comparar los efectos de los reguladores del crecimiento ANA, AIA, AIB contra un tratamiento control en su actividad inductora de raíces

Analizar el comportamiento de los brotes en dos estados físicos del medio de cultivo : sólidos y líquidos.

Para el tipo de Explante:

Comparar las secciones de tallo, hoja y pecíolo, en su capacidad morfogénica

En Invernadero y Vivero:

Evaluar el efecto de la época de colecta de estacas semileñosas en su respuesta a la brotación y enraizamiento.

---

Comparar los ambientes de invernadero y vivero en la brotación y enraizamiento de estacas de tallo.

## II REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Ubicación taxonómica y descripción botánica del nim

Segun Bailey (1977), el nim tiene una clasificación taxonómica como sigue:

Reino	Vegetal
División	Embriofitas
Subdivisión	Angiospermas
Clase	Dicotiledóneas
Orden	Geraniales
Familia	Meliaceae
Género	<i>Azadirachta</i>
Especie	<i>indica</i>

Tiene como sinónimos : *Melia azadirachta* L. y *Melia indica* A Juss (Anónimo, 1987).

Los nombres comunes con los que se le conoce son: nim, nimb, nimba (India antigua), árbol margosa (en árabe), vepam, nib, tin, nimmi, azad dirakt (en Persa) (Anónimo, 1987).

La familia Meliaceae se caracteriza por tener flores hermafroditas, axiales, pentámeras, bisexuales que se agrupan en panículas. Las hojas son bipinadas, pecioladas y con un gran número de folíolos. En la corteza y en las hojas de las Meliáceas, que casi todas son leñosas, existen también células secretoras. En total, esta familia reúne hasta 750 especies, que viven de preferencia o exclusivamente en los países cálidos. Entre los árboles más importantes de ésta familia, tenemos los que proporcionan aquellas maderas de grano finísimo, de gran dureza, densas y de un color rojo caoba (Jeques, 1946; Font, 1974).

El nim es un árbol robusto, siempreverde, de rápido crecimiento, con tronco recto, corteza moderadamente gruesa y

copa redonda. Alcanza una altura de 7 a 20 m, y el diámetro de la copa es de 5 a 10 metros (Anónimo, 1987).

La producción de frutos se inicia a los 4 ó 5 años y se estabiliza a los 10. Después se obtienen 30 a 50 kg de frutos anualmente y puede vivir por más de 200 años. Los frutos (Figura 1A) son del tamaño de un cacahuete sin cáscara y caen al suelo cuando maduran (Jacobson *et al.*, 1983; Garza, 1987).

## 2.2 Origen y distribución

El nim se considera nativo del Sub-Continente Indo-Pakistano y se localiza en la India, Sri-Lanka, Indonesia, Malasia, Haití, Surinam, Tailandia, Nigeria, Sudan, Etiopía, Somalia, Kenia, Tanzania, Mozambique, Bangladesh, Mauritania, Tongo, Costa de Marfil, Camerún, Fiji, Mauricio, Birmania; y recientemente ha sido introducido en Arabia Saudita, Nicaragua, Filipinas, Yemen, Estados Unidos, Argentina, Brasil, Chile, Islas Virgenes, Puerto Rico y México (Ahmed y Grainge, 1985). (Figura 2A)

El nim tolera suelos secos y pobres, su vasto sistema radicular desarrolla una capacidad fisiológica única para extraer elementos nutritivos de suelos arenosos y lixiviados. El nim es una especie tropical de rápido crecimiento. Puede habitar tanto en zonas subhúmedas como semiáridas, y en suelos con buen drenaje, y puede llegar a ser susceptible a heladas en sus etapas jóvenes de crecimiento. Es tolerante a suelos con sales, y se adapta a latitudes que varían de 5 ° Latitud Sur hasta los 35 ° Latitud Norte (Font 1974; Ahmed y Grainge 1985; Anónimo 1987).

### 2.2.1 Distribución en México

La Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León inició la disseminación de arbolitos en Octubre de 1990 a Centros de Investigación, Instituciones Educativas, Viveros y Agricultores de la región y del País. Se han repartido a la fecha

546 árboles en 20 Estados de la República (Figura 3A) localizados en 171 sitios diferentes de 85 municipios (Leos y Salazar, 1992).

### 2.3 Importancia

En general se ha reportado efectividad del nim en el control de más de 100 insectos, ácaros nemátodos y de insectos de almacén. También puede ser empleado para combatir algunos insectos urbanos, tales como la mosca doméstica y las larvas de zancudos. Se usa como repelente o disuasivo de la alimentación y de la deposición de huevecillos, pero su principal acción es la de regular el desarrollo de los insectos, posiblemente interfiriendo en la concentración de las hormonas que regulan la muda (Stein y Parrella 1985; Anónimo 1987, Anónimo 1991).

Las hojas han dado buen resultado en el control de los insectos. Se necesitan de 60 a 150 kg de hojas para proteger 2 ó 3 toneladas de grano, y de 50 a 200 kg de pasta para proteger una hectárea de arroz (Atrri y Prasad, 1980).

El nim ha resultado ser efectivo y también es seguro para mamíferos y el ambiente. Por ser productos naturales, los insecticidas del nim son biodegradables, aunque hasta la fecha solo dos han sido aprobados: el Margosan-0<sup>MR</sup> (cuyo nombre proviene de "margosa", uno de los nombres comunes del nim), y la Azatina<sup>MR</sup> producida por AgriDyne Technologies (Jotwani y Sircar, 1965; Anónimo, 1987).

En la India el nim se usó por muchos años para curar enfermedades y dolencias, era prácticamente la botica del pueblo. Actualmente es usado por muchos países como fuente de aceite. Aproximadamente el 60% de aceite del nim producido en la India se usa para la manufactura de jabones, pasta de dientes y cosméticos (Figura 4A) (Winters y Williams, 1982).

Varias partes del nim tienen acción antihelmíntica, antiperiódica, antiséptica, antisifilítica, astringente, demulcente, emenagógica, emoliente y purgativa. Además se usa para el tratamiento de tumores, enfermedades venéreas y úlceras (Achundow *et al*, citados por Garza, 1987; Lagunes y Rodríguez, 1989).

Los aldeanos Indo-pakistaníes se bañan en agua mezclada con nim para prevenir erupciones y tumores. Las ramas del nim son usadas para lavarse los dientes, también con el mismo fin se usa la pasta de nim. El nim es un excelente árbol de sombra y se considera que el hecho de permanecer bajo su sombra ayuda a la salud según los aldeanos Indo-Pakistaníes (Garza, 1987).

Los agricultores de la India barren y recojen los frutos de árboles de sus plantíos, luego los venden a negocios que fabrican aceites, lo que ayuda a las economías locales a través del establecimiento de cultivos comerciales e industrias viables en las áreas rurales (Leos y Salazar, 1992).

También se ha usado para la fabricación de esmalte para uñas, pegamentos, lubricante de maquinaria, combustible para calentar e iluminar, e inclusive en su conversión a polyol puede ser usado para impulsar cohetes (Anónimo 1987, Leos y Salazar, 1992).

La madera del nim es dura y se parece a la caoba Cubana, por ser resistentes al ataque de termita y a las pudriciones, se usa mucho en la construcción. Su resina es un sustituto del pegamento (Ketkar, 1977; Washington International Center, 1985).

## 2.4 Propagación sexual de plantas

La propagación de las plantas es una ocupación fundamental de la humanidad, teniendo sus inicios probablemente cuando el hombre antiguo aprendió a sembrar y a cultivar ciertas clases de plantas que satisfacían sus necesidades nutritivas y las de sus

animales. A medida que avanzó la civilización, se fué añadiendo a la diversidad de plantas otros cultivos, no sólo alimenticios sino aquellos que le proporcionaban fibras, medicinas, ocasión de recreo y ornato. De la gran diversidad de plantas, el hombre ha seleccionado aquellas que le han sido más útiles para su bienestar (Rodríguez, 1986).

En la época actual, el mejoramiento de plantas ha sido precedido por un gran progreso en la selección de las mismas. Así al paso del tiempo algunas plantas fueron evolucionando a "tipos" que diferían por completo de sus ancestros silvestres. Sin embargo, ésta serie de procesos hubieran carecido de importancia, a menos que simultáneamente, se dispusiera de métodos para mantener en cultivo a las plantas seleccionadas y mejoradas con lo que originó así la invención y descubrimiento de los métodos de propagación de plantas (Hartman y Kester, 1980).

Las plantas superiores se reproducen de manera natural por semillas. Una de las características de la producción por semilla es la variación que puede existir dentro de un grupo de plántulas. Sin embargo la propagación de plantas cultivadas requiere que durante la reproducción de la semilla se controle la variabilidad, pues de otra manera puede perderse el valor del cultivar (Hartman y Kester 1980).

El nim inicia su producción de frutos (los cuales contienen la semilla) a los 4 ó 5 años y se estabiliza a los 10. Después se obtienen de 30 a 40 kg de frutos anualmente.

#### 2.4.1 Propagación por semilla del nim

##### 2.4.1.1 Método de cultivo

Jacobson, *et al.*, 1983 reportan que estudios hechos en Puerto Rico sobre la germinación del nim, mostraron que las semillas secas o inmaduras se pudrieron al ser plantadas en el suelo. Por

se decidió sembrarlas en charolas planas con agujeros en el fondo, a las cuales se les puso primero una capa de piedras de tamaño pequeño (0.5 cm y luego una de arena). Las semillas fueron cubiertas con 0.5 cm de arena y regadas por goteo usando un embudo de separación con una pipeta pasteur ajustada para formar pequeñas gotas. La cantidad fue regulada a tres gotas por minuto. La charola fue cubierta parcialmente con dos vidrios colocados sobre varillas de vidrio y el agua entraba a la charola a través de una abertura entre los vidrios. Las charolas fueron colocadas en un invernadero a una temperatura constante de 32° C. Con este método se obtuvo una germinación completa.

Cuando las plántulas tuvieron un mes de edad, fueron trasplantadas a macetas de barro y cuando alcanzaron una altura de 30 a 45 cm, se procedió a trasplantarlas en el campo.

Se ha reportado que las semillas del nim pierden su viabilidad en el transcurso de dos semanas, pero la semilla madura ya sin la pulpa o mesocarpio del fruto puede ser almacenada por un largo período (más de un año) en un lugar fresco y seco sin perder la viabilidad.

Las tres experiencias existentes en la FAUANL se obtuvieron en 1989, 1990 y 1993, con semillas que se importaron en 1989 del IRRI en Manila, Filipinas; en 1990 con semillas de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, en Honduras; y en 1993 con semilla propia de la FAUANL (Leos *et al.*, 1994).

En Agosto de 1989 se sembró en una mezcla de 2/5 partes de arena de río, 2/5 partes de tierra de hoja y 1/5 parte de perlita, como sustrato. La mezcla se puso en bolsas de plástico de un litro de capacidad y se colocaron las semillas individualmente a una profundidad de 1.5 cm. Las bolsas se colocaron en un invernadero con temperaturas de 32° C en la mañana y 37° C en la tarde. El sustrato se mantuvo muy húmedo por 30 días con riegos pesados semanales con agua que contenía 2 g por litro de Captan 50 PH

para prevenir pudriciones. Después, el riego se dió mas ligero y con la manguera. La emergencia de plantas se inició ocho días después de sembradas y llegó a su máximo (91%) el 22 de septiembre. En noviembre se pasaron las plantulas a bolsas de polietileno de 5 l de capacidad. Se tomaron datos periódicos de las condiciones de temperatura y humedad relativa del invernadero y sombreadero, también se midió el crecimiento de las plantas. Se tuvieron problemas con heladas, clorosis, enfermedad por *Rhizoctonia sp* lo que ocasionó que 77 plantas murieran (Leos y Salazar 1992).

En 1990 se recibieron en la FAUANL 200 semillas procedentes de Honduras. Estas fueron obtenidas de árboles que habían crecido en ese país y que fueron plantados en 1981, usando semillas provenientes de Haití. Se hizo una selección de semillas: 89 fueron eliminadas por estar quebradas y el resto se clasificó en cuatro grupos de acuerdo a su tamaño. Fueron sembradas el 16 de Noviembre, en condiciones similares a las que se emplearon con las semillas de Filipinas. La germinación fue lenta y se encontró un efecto en el porcentaje de germinación de acuerdo al tamaño de la semilla, para las de tamaño medio fue 11% y las de tamaño grande fue 10.7%; de las pequeñas solo se obtuvo un 2.6%. Germinaron sólo 104 semillas, pero sólo 73 plantas sobrevivieron después de seis meses. Después de un año, las plantas seguían mostrando los efectos del tamaño de sus semillas, las había de tamaño bajo, medio y alto; éstas mostraron en promedio ser más altas que las plantas obtenidas de semillas provenientes de Filipinas de la misma edad.

La temperatura no fue la razón de la baja germinación, ésta era igual que para las de Filipinas. La primera y la última emergencia de plántulas se obtuvo a los 20 y a los 62 días después de la siembra respectivamente. Se distribuyeron en Nuevo León 45 arbolitos de los cuales 22 se repartieron en un solo municipio. Dos plantas se enviaron a Guadalajara; otros 14 árboles se plantaron en un huerto, pero con la helada de febrero de

1993 se murieron 12 de ellos. Se estima que 12 arbolitos se han perdido.

La tercera experiencia que tuvo la FAUANL fue con semilla producida en México. Algunos árboles que crecieron de semillas provenientes de Filipinas que se encuentran localizados en el campo experimental y en pueblos cercanos mostraron pocas flores en 1992, pero la buena floración y fructificación en 1993 de árboles de cuatro años de edad. Los frutos se colectaron y se separaron en ocho grupos de acuerdo a: el árbol individual, el método de recolección y la calidad (por maduración, color y humedad). La pulpa fue removida de las semillas, se trataron con fungicida y se sembraron como se hizo en el caso de las semillas de Honduras. La fecha de siembra fue el 26 de agosto. Dos semanas después, cinco plantas emergieron, y la última emergencia de plántulas fue a los 47 días. El más alto valor (68.9%) de emergencia fue para la semillas de primera calidad, que provenían de frutos maduros. En cuanto a la segunda calidad, se obtuvo un 55.3 %. Los otros grupos de semillas demostraron bajos porcentajes de germinación, porque las semillas eran muy viejas o tenían una deficiente maduración; no obstante, de éstos valores, el más alto fue igual que el mostrado en las semillas provenientes de Honduras.

## 2.5 Propagación asexual de plantas

### 2.5.1 Estacas

Las estacas son partes separadas de una planta madre, puede ser un trozo de tallo, estacas de raíz ó estaca de hoja, las cuales puestas en condiciones ambientales favorables son capaces de emitir raíces, brotes y tallos dando origen así a una nueva planta, que en la mayoría de las veces son iguales a la planta de la cual proceden (Hidalgo, 1983; Hammett, 1984).

La propagación por estacas, es el método más importante para propagar arbustos ornamentales, tanto de especies caducifolias como de especies perennifolias de hoja ancha o de hoja angosta (Hidaigo, 1983).

Cuando las estacas del tallo son herbáceas, se les llama esquejes y si tienen madera, se conocen como estacas. En ningún caso tienen raíces. Los cítricos, la higuera y el avellano son fáciles de enraizar; por el contrario, el aguacate, el mango y el zapote son muy difíciles (Berlijn, 1982).

#### 2.5.1.1 Tipos de estacas

Las estacas casi siempre se hacen de las porciones vegetativas de la planta, como los tallos, los tallos modificados (rizomas, tubérculos, cormos y bulbos) las hojas o las raíces (Brunberg y Sartori, 1968).

Se pueden hacer diversos tipos de estacas que se clasifican de acuerdo con la parte de la cual proceden: estacas de tallo, estacas de hoja, estacas de hoja y yema, y estacas de raíz. A su vez, las estacas de tallo de acuerdo con su consistencia pueden ser: de madera dura, semidura, suave y herbáceas (Calderón, 1977; Hartman y Kester, 1980).

#### 2.5.1.2 Factores que influyen en el enraizado de estacas

Según Hartman y Kester en 1980, el enraizado puede ser favorecido o estimulado por los siguientes factores:

1.- Estado nutricional de la estaca. Se refiere al hecho de que las estacas de madera leñosa o del crecimiento del año anterior son las más bien nutridas y por ende las más fáciles de enraizar que las semileñosas o sea basales del crecimiento del año en curso y algo semejante ocurre con las tiernas o brotes apicales que no tienen reservas alimenticias.

2.- **Medio enraizante.** En general se puede decir que entre más suelto sea el medio enraizante es relativamente más fácil la emisión de las raíces. Se recomienda usar arena, aserrín, vermiculita, perlita, agrolita ú otros productos o mezclas sintéticas afines. Todos éstos medios se emplean con estacas semileñosas y tiernas, mientras que las leñosas enraizan en suelo directo.

3.- **Acido indolbutírico y cofactor es.** Casi todas las auxinas producen efecto enraizante, pero más en particular el Acido Indolbutírico (AIB); existen además algunas enzimas como Rutin o algunos carbohidaratos como el azúcar que tienen un efecto favorable en la emisión de raíces por parte de las estacas, éstos fitoreguladores y sustancias en general se usan comunmente en estacas semileñosas y tiernas, mientras que poco en las leñosas.

4.- **Alta humedad relativa.** Artificialmente puede provocarse una lluvia intermitente para simular lluvia y aumentar la humedad relativa, lo que en estacas semileñosas y tiernas con hojas facilita la actividad del follaje y en consecuencia la emisión de las raíces.

5.- **Etiolado o acodado.** Consiste en aplicar un hule oscuro en una porción del tallo de la parte interna del árbol, de ésta forma se logra que se empiecen a formar raíces adventicas en el tallo como consecuencia de dicha oscuridad.

6.- **Ubicación de las estacas.** Generalmente la porción media del árbol es la más susceptible de enraizar, así como la porción media de la rama del árbol; debido a que las porciones apicales son más tiernas y las basales muy lignificadas, por ende las porciones medias son las más recomendables.

7.- **Corte de la estaca.** En cuanto al corte basal, lo más recomendable es realizarlo ligeramente por debajo de una yema ya que ahí es el nudo es donde comúnmente se acumulan reservas

nutritivas y el corte deberá de ser sesgado en la parte apical para evitar posibles inversiones en cuanto a la polaridad se refiere.

8.- Posición de la estaca. Entre más horizontal se encuentre ésta, es más fácil la brotación radical y aérea debido a la menor resistencia o dificultad para el ascenso de la savia; cabe aclarar que normalmente se siembran verticales o ligeramente horizontales para evitar dificultades al momento de la extracción de las estacas ya enraizadas.

9.- Anillado. Dentro de la rama leñosa o semileñosa de un árbol, se pueden anillar las ramas removiendo exclusivamente la corteza de 3 a 5 cm de distancia permitiéndole así el ascenso de la savia más no así el descenso obstruyendo el paso de nutrientes y acumulándose entonces en la parte superior de dichos cortes, que al ser las estacas desprendidas o separadas de la planta ligeramente por debajo del anillado a los 15 a 30 días, nos permite tener más reservas alimenticias para el momento de enraizar.

10.- Factores climáticos. Estos factores juegan un papel importante en la capacidad de curación y desarrollo de las raíces de los esquejes. Debido a que no tienen raíces, se debe retrasar el crecimiento en altura hasta que se desarrolle un sistema de raíces que lo balancee. Para que haya un óptimo crecimiento sin marchitamiento, debe existir un equilibrio entre la humedad, el agua, la temperatura y la luz solar. La remoción de las hojas debe de ser mínima, ya que, cuanto mayor sea el área foliar turgente, más práctica se tomará para la producción de hormonas y carbohidratos. Una baja temperatura del aire retarda la respiración y el crecimiento en altura. Con una humedad relativa alta se requiere menos agua, por lo tanto, se absorberá el dióxido de carbono en las hojas, se producirá la fotosíntesis y se obtendrán los carbohidratos y las hormonas necesarias (Hartman y Kester, 1980; Halfacre y Barden, 1984).

### 2.5.1.3 Tratamiento de las estacas con reguladores de crecimiento

El objeto de tratar con reguladores del crecimiento como las auxinas, es aumentar el porcentaje de estacas que formen raíces, acelerar la formación de las mismas, aumentar el número y la calidad de las raíces formadas en cada estaca y aumentar la uniformidad del enraizamiento. El empleo de éstos materiales es en especies cuyas estacas enraizan con dificultad. El uso de sustancias que promueven el enraizamiento no permite que se ignoren las buenas prácticas de propagación por estacas, como el mantenimiento de las relaciones de agua y las condiciones de luz y temperatura adecuadas (Hidalgo, 1983).

Las preparaciones comerciales en polvo traen instrucciones completas para su uso, junto con una lista de plantas que con más seguridad responden a cada preparación. Las especies leñosas, difíciles de enraizar, se deben tratar con las preparaciones más concentradas, en tanto que las especies tiernas, suculentas y de fácil enraizamiento se deben tratar con materiales de menor concentración (Kramer, 1982; Hidalgo, 1983).

El polvo que se adhiere a las estacas después de haberlas sacudido ligeramente, es suficiente para producir el efecto deseado. Si hay poca o ninguna humedad natural en la base de las estacas se pueden humedecer presionándolas contra una esponja mojada y así se les adherirá el polvo (Kramer, 1982).

Las estacas se deben insertar en el medio de enraice inmediatamente después del tratamiento. Para evitar que se caiga el polvo al encajar las estacas en el medio, se puede hacer en éste un corte con una navaja gruesa antes de insertar las estacas (Hammett, 1984).

### 2.5.1.4. Medios para enraizamiento

Las estacas de muchas especies enraizan con facilidad en una

gran diversidad de medios. En las plantas que enraizan con dificultad, el medio de enraice puede influir mucho no sólo en el porcentaje de las que enraicen, sino también en la calidad del sistema radical que se forme (Hidalgo, 1993).

Las combinaciones de algunos materiales, por lo general dan mejores resultados que empleando cualquiera de ellos solos. Para determinar la mejor mezcla para enraizado, es aconsejable experimentar con las plantas en las condiciones ambientales en que se va a trabajar (Hidalgo, 1983; Hammett, 1984). A continuación se describen algunos medios para enraizamiento:

1.- Suelo. El suelo se usa para plantar estacas caducifolias de madera dura y estacas de raíz. Un migajón arenoso bien aireado es preferible a un suelo arcilloso pesado; en el primero un mayor porcentaje de estacas forman raíces que suelen ser de mejor calidad. Además en suelos arenosos más ligeros, las estacas pueden plantarse y después del enraice, sacarse mucho más pronto después de las lluvias que si se plantan en suelos pesados.

2.- Arena. La arena se usa mucho como medio para enraizar estacas. Es relativamente poco costosa y fácil de obtener. La que puede conseguirse de los comerciantes en materiales para construcción y que se emplea para limpia, con aristas agudas, libre de materia orgánica y de tierra es excelente. La arena debe ser lo suficientemente fina como para retener algo de humedad alrededor de las estacas y lo bastante gruesa para permitir que el agua se drene fácilmente a través de ella.

3.- Musgo turboso. Este en ocasiones se añade a la arena en proporciones diversas para aumentar la capacidad de retención de agua en la mezcla. Esta combinación es un buen medio para el enraizado de estacas de la mayoría de las especies. Las mezclas usadas varían entre dos partes de arena por una de musgo turboso, y una parte de arena por tres partes de musgo turboso.

4.- Vermiculita. Las pruebas realizadas han demostrado que las estacas de diversas plantas han enraizado mejor en vermiculita con partículas de tamaño grande, en tanto que otras lo hacen mejor cuando las partículas de este material son pequeñas.

5.- Perlita. Se usa mucho como medio de enraice para estacas de hojas, especialmente bajo niebla, debido a sus buenas propiedades de drenaje. Se puede usar sola, pero es mejor si se emplea mezclada en diversas porciones con musgo turboso o vermiculita.

6.- Agua. El agua desde hace mucho tiempo se ha usado para el enraizamiento de estacas de fácil enraice. Su mayor desventaja es la falta de aireación. Las pruebas realizadas han demostrado que aireando artificialmente el agua con oxígeno, se puede tener un excelente enraice de las estacas de algunas especies (Hartman y Kester 1980).

### 2.5.2. Micropropagación

Los tres métodos de micropropagación vegetal existentes son: embriogénesis somática, organogénesis y brotación axilar (Martínez 1992; Ojeda, 1993).

#### 2.5.2.1 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es un proceso a través del cual se da origen a un embrión que no es producto de la fusión gamética. La inducción de embriones somáticos puede realizarse directamente de tejidos como en cítricos y mango, ó indirectamente pasando por callo. Las primeras publicaciones a este respecto se realizaron en 1958 en zanahoria, y a la fecha hay reportes de hasta 80 especies (Fuller y Gallon, 1985).

Los embriones iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos se les denomina embriones asexuales, adventicios o somáticos; los cuales son estructuras bipolares con un eje radical-apical sin conexión vascular en el tejido materno, donde dichas estructuras deben ser capaces de formar plantas normales. Sin embargo, la naturaleza de la diferenciación que se registra como resultado de la embriogénesis somática no ha sido probada y las interpretaciones de los eventos que ocurren tempranamente en las células y que traen consigo la diferenciación de plantas a partir de callos siguen siendo hipotéticas (Litz y Jarret, citados por Iracheta, 1993). Por consiguiente, estos mismos investigadores consideran que todos los tejidos vegetales tienen capacidad para formar callos *in vitro*; pero solo pocos explantes poseen la habilidad para producir callos embriogénicos; por lo general se han empleado como explantes hipocotilos y embriones; adicionalmente, se han usado ápices caulinares, segmentos de tallo, hojas, raíces e inflorescencias inmaduras (Kyte, 1983; Villalobos, 1985).

Los factores que determinan la inducción de embriogénesis somática son principalmente la especie, el genotipo, el medio de cultivo, la edad y sobre todo, los reguladores del crecimiento.

En relación con el tiempo en cultivo, se tiene bien establecido que conforme transcurre el tiempo, se va perdiendo la totipotencia debido a cambios cariotípicos y de ploidía en respuesta a la presencia de auxinas, además de cambios epigenéticos probables.

La inducción con el uso de reguladores del crecimiento, tiene particularidades especiales ya que se requiere de un choque auxínico en la mayoría de los casos, es decir, cultivar los callos en presencia de 2,4-D y subcultivar en un medio ausente de éste.

La principal aplicación de ésta técnica va encaminada a la formación de "semillas" sintéticas mediante la producción de

embriones somáticos y su encapsulación (Villalobos, 1985).

### 2.5.2.2 Organogénesis

La organogénesis es un proceso que da lugar a la formación de órganos adventicios. El antecedente más remoto data de 1957 cuando Skoog y Miller (citados por Villalobos, 1985) trabajando con tabaco encontraron que la relación auxinas/citocininas regulaba el proceso organogenético, de tal forma que la relación alta inducía la producción de raíces, mientras que una proporción baja producía brotes (Rodríguez, 1986).

Organogénesis es un término en cultivo de tejidos que se refiere a la diferenciación del explante (Thorpe, 1978) y comprende el desarrollo de yemas directamente ó a partir de callos donde la formación de órganos en explantes se conoce como ruta de la organogénesis indirecta, donde un callo sin estructura organizada puede dar origen a brotes y raíces. A éste proceso se le conoce con el nombre de brotación adventicia. Todas las partes de la planta se han usado como explantes para la iniciación de callo, sin embargo, los tejidos jóvenes poseen un alto grado de actividad meristemática y tienden a tener más plasticidad *in vitro* (Fuller y Gallon, 1985).

Tisserat y Hussey (citados por Martínez, 1992) consideran que la regeneración a través de la organogénesis puede lograrse por medio de los siguientes modelos:

- 1- Producción de órganos adventicios originados de callo, derivado éste a su vez del explante (brotes adventicios via callo).
- 2- Emergencia de órganos adventicios directamente del explante sin la intervención de la fase de callo (regeneración directamente del explante cultivado).

En 1966 Torrey, planteó la hipótesis que explica el proceso consistente en la formación de meristemoides a partir de células aisladas o agregados celulares que desarrollan brotes. Este esquema ha sido comprobado y ejemplificado en varias especies, entre ellas en *Pinus radiata* (Cooping y Rodgers, 1985; Villalobos, 1985)

La organogénesis está regulada por muchos factores, siendo los principales: la especie, el balance de los reguladores del crecimiento y aspectos químicos, aunque éste último factor es muy difícil de conocer su influencia, debido a que nunca se le separa de los factores físicos, de interacción y menos aún dentro de los químicos. En el caso de la especie, los ejemplos más comunes son: tabaco, *Pseudotsuga* y *Pinus radiata* (Dixon, 1985).

#### 2.5.2.3 Brotación axilar

La brotación axilar es el método de micropropagación más usado, usa yemas axilares (segmentos nodales), ápices y meristemas como explantes. Es el proceso más sencillo para regenerar una planta debido a que se parte de estructuras ya diferenciadas y solamente es necesario romper su represión, debido a la dominancia apical mediante la inclusión de citocininas en el medio de cultivo.

#### 2.5.2.4 Etapas de la micropropagación

En la propagación *in vitro* se pueden diferenciar cuatro fases ó etapas, mismas que tienen características específicas (Murashige 1974, citado por Iracheta, 1993; Villalobos, 1986).

La primera es el establecimiento aséptico en la que el método de desinfección y el medio de cultivo desempeñan un papel importante. Aquí el objetivo es simplemente obtener un cultivo aséptico de la planta en cuestión. El cultivo puede resultar en un alargamiento de brotes, enraizamiento ó producción de callo.

La segunda es la proliferación y multiplicación del propágulo. Existe un rápido desarrollo de brotes que pueden ser de origen axilar o adventicio; los primeros se originan a partir de yemas situadas en la axila de la hoja y los segundos a partir del callo de la base del brote.

La multiplicación de los propágulos puede incrementarse induciendo órganos adventicios, formando embriones o aumentando la inducción de brotes axilares. En muchas especies, el método más adecuado de multiplicación es la organogénesis adventicia o embriogénesis somática. En muchos casos, la formación de callo es empleada como una forma de multiplicación de propágulos (Villalobos, 1985).

La tercera fase la constituyen el enraizamiento y la aclimatación. Esto involucra la inducción y diferenciación de raíz en los brotes obtenidos durante la proliferación, debiéndose emplear sustancias que promuevan la rizogénesis como las auxinas. Esta etapa está programada para preparar propágulos para su establecimiento al transferirlos al suelo. Aquí se involucra el enraizamiento de los brotes cortados.

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Para que las plántulas regeneradas *in vitro* tengan un mayor porcentaje de sobrevivencia cuando sean transferidas al suelo es necesario incluir aclimatación para impartir tolerancia a la falta de humedad.

Finalmente la cuarta fase es el reestablecimiento de las plantas en el suelo; es la conversión de las plantas del estado heterotrófico al estado autotrófico (Strret, 1973, Rodríguez, 1986).

### 2.5.2.5. Ventajas de la micropropagación

Las técnicas usadas en la propagación *in vitro* han despertado mucho interés en los últimos años, pasando de los estudios

botánicos y fisiológicos a una aplicación más práctica, y colaborando de una manera más directa o indirecta en varias actividades comerciales (Thorpe, 1978; Hurtado y Merino, 1987).

Hasta la fecha el éxito logrado en la multiplicación clonal ha sido en especies que se propagan por métodos asexuales y convencionales, con excepción de algunos cultivos de importancia agronómica (caña de azúcar, papa, espárrago, fresa) no se ha aplicado a los demás cultivos, pues la mayoría son propagados por semilla. Una de las ventajas de la micropropagación radica en la rápida producción de grandes cantidades de plantas con un mínimo de material vegetal (Hussey 1986, citado por Ojeda, 1993).

Con la técnica de micropropagación se puede generar variabilidad para luego usarla en la producción de variedades sobresalientes de alto rendimiento, entre otras aplicaciones (Ojeda, 1993).

Huang *et al.*, (1985) señalan que la metodología *in vitro* tiene muchas ventajas sobre las técnicas tradicionales de propagación asexual. Además de las altas tasas de multiplicación anotan que se obtiene una buena estabilidad genética de las plantas; que se disminuye el espacio individual para un lote de plantas madre; que se obtiene un mejor control en la sanidad de las plántulas al poder trabajar bajo condiciones asépticas. y al poder emplear varios métodos de eliminación de patógenos.

Actualmente el cultivo *in vitro* es reconocido como una herramienta en las prácticas hortícolas y es un método importante para la propagación de un amplio grupo de plantas (Evans, 1989, citado por Ojeda, 1993).

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Localización

El presente trabajo se desarrolló de abril de 1992 a mayo de 1993 en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, en el invernadero y en el vivero de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (F.A.U.A.N.L.) localizados en el municipio de Marín, N. L. cuya ubicación geográfica es a los 25° 56' latitud norte y 100° 03' longitud oeste del meridiano de Greenwich, presentando una elevación de 375 m.s.n.m.

El clima que predomina en la región es semidesértico BS(h')hx(e'), según la clasificación de Koppen modificado por García (1973) para México; las temperaturas medias anuales son de 22° C, los meses más fríos son Diciembre y Enero con temperaturas promedio mensuales inferiores a los 18° C, siendo en ocasiones muy extremosas, ya que entre el día y la noche puede oscilar hasta en 14° C. Las temperaturas más altas se presentan en los meses de Julio y Agosto, siendo éstas mayores de 32° C.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

#### 3.2 Material de laboratorio y campo

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los materiales y equipos empleados en la presente investigación pueden dividirse en equipo e instrumental, material de cristalería, compuestos químicos, material de laboratorio diverso y material de campo.

##### 3.2.1 Equipo e instrumental

Se usaron los siguientes aparatos: balanza analítica Sartorius 160 g, balanza granataria Ohaus, horno de microondas Panasonic 0.8 pies<sup>3</sup>, camapana de flujo laminar Alder, autoclave Napco 8000, olla de presión All american 25k, potenciómetro Corning 103, termómetro, regulador de fotoperiodo Kmart (reloj) y agitador magnético Corning.

### 3.2.2 Material de cristalería

Se usaron cajas petri, probetas graduadas de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml, vasos de precipitado de 50, 250, 500 y 1000 ml, agitador manual de vidrio, recipientes de vidrio (Gerber<sup>MR</sup>) de 130 ml, tubos de cultivo (Sigma<sup>MR</sup>) de 150 mm x 25 mm, pipetas de 0.5, 1, 2, 5 y 10 ml.

### 3.2.3 Compuestos químicos

Los compuestos químicos usados fueron los siguientes:

Agentes desinfectantes: alcohol al 80 y 96%, detergente, hipoclorito de sodio en solución comercial al 6% (Cloralex<sup>MR</sup>) y polioxetilen monolaurato (Tween-20).

Sales inorgánicas. Todos los medios utilizados en los experimentos fueron adquiridos en forma de mezcla de sales basales Sigma<sup>MR</sup>, cuya presentación fue en frascos con 4.3 g de polvo con el que se puede preparar un litro de medio. La composición de estas sales se puede observar en el Cuadro 1.

Reguladores del crecimiento: ácido indolbutírico (AIB), ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), 6-bencilaminopurina (BAP), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina (KIN), todos ellos marca Sigma<sup>MR</sup>.

Vitaminas (Sigma<sup>MR</sup>): tiamina y piridoxina.

Azúcares : sacarosa (azúcar de mesa) y mio-inositol (Sigma<sup>MR</sup>).

Sustancias de soporte: Phytigel (Sigma<sup>MR</sup>) y puentes de papel filtro.

Cuadro 1. Composición de la mezcla de sales inorgánicas MS (Sigma<sup>MR</sup>).<sup>1</sup>

Compuesto	mg
Nitrato de amonio	1650.0
Acido bórico	6.2
Cloruro de calcio	332.2
Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
EDTA hidratado	37.26
Sulfato ferroso heptahidratado	27.8
Sulfato de magnesio	180.7
Sulfato de manganeso	16.9
Nitrato de potasio	1900.0
Fosfato de potasio monobásico	170.0
Molibdato de sodio dihidratado	0.25
Sulfato de zinc heptahidratado	8.6

<sup>1</sup> Datos del fabricante

#### 3.2.4 Material de laboratorio diverso

Otros utensilios usados fueron: lámparas de alcohol, pinzas de disección, mango y hojas de bisturí, espátulas, pisetas, algodón, charolas, papel secante, papel aluminio, papel filtro, tapas de poliestireno, estantería metálica, regla métrica y cepillos de cerdas suaves.

#### 3.2.5 Material de campo

Para el trabajo de propagación por estacas, se emplearon tijeras de podar, regla métrica, vernier, enraizador comercial Rootone<sup>MR</sup> (0.1% de Acido indolbutírico y 0.2% de naftalenacetamida como ingredientes activos), cajas de propagación y perlita.

### 3.3 Material Vegetal

El material vegetal utilizado fueron árboles de uno y tres años de edad establecidos en el Campo Agrícola Experimental de la Facultad de Agronomía de la U. A. N. L., en Marín N. L., mismos que fueron obtenidos a partir de semillas enviadas por el Instituto Internacional de Investigación en Arroz (IRRI), localizado en Manila, Filipinas.

En algunos experimentos se usaron segmentos nodales, los cuales contenían a las yemas axilares; en otros, secciones de hoja, tallo y peciolo; y en otros, estacas semileñosas del año anterior.

### 3.4 Medio de Cultivo

El medio de cultivo empleado en la presente investigación fue el de Murashige y Skoog (1962), adicionado de tiamina, mio-inositol y reguladores del crecimiento. Como se mencionó anteriormente los compuestos inorgánicos fueron adquiridos en forma de una mezcla de sales en polvo, marca Sigma <sup>MR</sup>

El procedimiento para la elaboración del medio básico según recomendación del fabricante fue:

- 1- En un recipiente dos veces mayor que el volumen final deseado, se agregó un 90% del volumen final a preparar de agua bidestilada.
- 2- Mientras se agitó el agua, se fue agregando el polvo (mezcla de sales básicas).
- 3- Se enjuagó el frasco original con un poco de agua destilada para remover los restos de polvo y se agregó a la solución del paso número 2.

- 4- Se agregaron los suplementos utilizados: vitaminas, sacarosa, reguladores de crecimiento, etc.
- 5- Se ajustó el pH a  $5.7 \pm 0.1$  usando  $\text{NaOH}$  ó  $\text{HCl}$  1 y 0.1 N.
- 6- Se agregó la cantidad de agua bidestilada para lograr el volumen final deseado del medio.
- 7- Se solidificó el medio con la adición de Phytigel<sup>MR</sup> a razón de  $1.8 \text{ g l}^{-1}$  disolviéndolo en el horno de microondas durante 5 - 7 minutos.
- 8- Se sirvieron los recipientes o contenedores con el medio de cultivo caliente con una cantidad de 25 ml para los frascos Gerber<sup>MR</sup>, y de 12 ml para los tubos de cultivo; y luego se taparon.
- 9- Se esterilizó el medio de cultivo en una autoclave con una presión de  $1.1 \text{ Kgcm}^{-2}$  a  $121^\circ \text{C}$  durante un tiempo de 15 minutos.

Una vez preparado el medio se almacenó a una temperatura de  $26^\circ \text{C}$  durante tres ó cuatro días para verificar que no hubiera contaminación.

El medio de cultivo para todos los experimentos consistió en sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) adicionado de  $0.4 \text{ mg l}^{-1}$  de tiamina,  $100 \text{ mg l}^{-1}$  de mio-inositol y  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de piridoxina. En algunos experimentos se agregaron diferentes reguladores del crecimiento. Se usaron las soluciones concentradas descritas en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Soluciones concentradas utilizadas en la preparación de los medios de cultivo en los experimentos de nim.

Soluciones	Concentración
Tiamina	20 mg/100 ml
Mio-inositol	1 g/100 ml
Piridoxina	20 mg/100 ml
BAP	20 mg/100 ml
Cinetina	20 mg/100 ml
AIA	20 mg/100 ml
AIB	20 mg/100 ml
ANA	20 mg/100 ml

### 3.5 Ambiente de cultivo

Los recipientes usados en los experimentos, fueron colocados en un cuarto de incubación el cual estaba regulado para proporcionar 16 horas luz y 8 horas oscuridad, mediante el uso de un conector de circuitos con reloj. El cuarto permaneció permanentemente a una temperatura de  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , la cual se logró con el auxilio de un aparato de clima artificial.

Debido a la relación existente entre el establecimiento aseptico *in vitro* y las condiciones climatológicas a las que se encontraban expuestas las plantas madre, además de la influencia climática sobre los experimentos de propagación por estacas en invernadero y vivero, se presentan en el Cuadro 3 las condiciones prevalcientes en Marín, N. L. durante el período que duraron dichos experimentos.

Cuadro 3. Condiciones climáticas prevalecientes en el Campo Experimental de la FAUANL en Marín, N. L. durante 1992 y 1993 <sup>1</sup>

Mes	T ° $\bar{X}$ mensual (° C)		T ° mínima (° C)		T ° máxima (° C)		Evaporación (mm)	
	1992	1993	1992	1993	1992	1993	1992	1993
	Ene	14.2	15.3	7.8	8.6	28.0	22.0	4.2
Feb	16.7	17.6	10.5	11.6	25.0	24.0	3.9	3.8
Mar	18.6	19.5	12.0	13.0	24.0	26.0	5.1	5.5
Abr	21.0	22.0	14.2	15.3	27.1	28.7	5.2	6.0
May	24.2	25.5	19.0	18.0	32.0	33.0	6.2	6.3
Jun	29.0	28.0	20.6	21.7	33.0	33.4	5.1	5.0
Jul	30.0	29.0	24.0	23.0	33.0	35.0	8.5	9.9
Ago	30.0	29.0	24.0	23.0	34.0	35.5	9.2	9.3
Sep	28.0	26.0	22.0	21.0	33.0	32.0	7.2	6.2
Oct.	24.0	22.0	18.0	16.0	30.0	28.0	5.2	4.4
Nov.	16.0	16.6	8.0	9.7	24.5	23.5	3.4	2.5
Dic.	15.0	16.0	8.5	9.0	21.5	24.0	2.5	2.9

<sup>1</sup> Datos proporcionados por el departamento de Ingeniería Agrícola de la FAUANL.

Se efectuaron un total de cinco experimentos, que comprenden: establecimiento aséptico, multiplicación, enraizamiento, morfogenesis y propagación por estacas. Algunos de éstos, fueron repetidos en dos o tres fechas distintas.

### 3.6. Establecimiento aséptico y brotación

El objetivo de ésta etapa fué desarrollar una metodología de desinfección de partes vegetativas de nim con la cual se lograra una asepsia adecuada.

Para el establecimiento de este experimento, se seleccionaron árboles del huerto de nim de tres años de edad del Campo Experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicado en Marín, N. L., los cuales fueron vigorosos y con una sanidad aparente. Se recolectaron baretas de nuevo crecimiento de alrededor de 20 cm de longitud, que se llevaron al laboratorio para removerles las hojas y darles un primer lavado con agua y detergente con ayuda de un cepillo de cerdas suaves.

Posteriormente, se cortaron segmentos de las baretas de 4 -5 cm de largo con un bisturí y se les dió un segundo lavado con agua y detergente, mismos que se colocaron en alcohol al 80% (v/v) durante 30 segundos y después se transfirieron a las soluciones desinfectantes las cuales estaban constituidas por las diferentes concentraciones de Cloralex<sup>MR</sup> que se especifican en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Tratamientos de desinfección a base de diferentes concentraciones de Cloralex<sup>MR</sup> y tiempos de inmersión utilizados para el establecimiento aséptico de segmentos nodales de nim.

Concentración de Cloralex <sup>MR</sup> (%)	Tiempos de inmersión (min)		
	5	10	20
5	1	2	3
10	4	5	6
20	7	8	9

Una vez concluido el tiempo de inmersión de los segmentos de bareta en su agente desinfectante (Cloralex<sup>MR</sup>) se realizaron tres enjuagues con agua bidestilada estéril en la campana de flujo

laminar, con el objetivo de quitar los residuos del desinfectante.

Después, se procedió a hacer los cortes con un bisturí a una longitud aproximada de 5-10 mm en una caja petri estéril, y finalmente, se procedió a colocar los explantes en cada recipiente conteniendo el medio de cultivo descrito en el apartado 3.4 adicionado de  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido naftalenacético y  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de 6-bencilaminopurina.

Después de haberse realizado la siembra, se colocaron los recipientes en el cuarto de incubación.

Se evaluó el efecto de tres concentraciones de Cloral ex<sup>MR</sup> (que es un blanqueador comercial que contiene hipoclorito de sodio al 6%) y de diferentes tiempos de exposición a éste. Las combinaciones de estos dos factores dieron nueve tratamientos los cuales se describen en el Cuadro 4. Este experimento se evaluó en dos fechas distintas: el 28 de septiembre y el 5 de noviembre de 1992.

Cada uno de los tratamientos anteriores tuvo entre siete y ocho repeticiones, y se establecieron en tubos de cultivo de 125 x 25 mm con 12 ml de medio, bajo un diseño completamente al azar, realizando un arreglo factorial.

Para el análisis de varianza se procesaron los datos obtenidos considerando a cada época como repetición, aún y cuando cada uno de éstos datos se obtuvieron de siete a ocho tubos de cultivo. Para la realización de dicho análisis de varianza, se utilizó la transformación del arcoseno de la raíz cuadrada de los datos del porcentaje original (Snedecor y Cochran, 1971).

La evaluación de los resultados se efectuó a los cinco, 10 y 20 días después de la siembra, y se basó en el conteo del porcentaje de tubos contaminados, los siete u ocho tubos de cada fecha se tomaron como el 100%.

### 3.7 Multiplicación

El objetivo de ésta etapa fué promover la brotación y el crecimiento de yemas axilares, mediante el empleo de dos fitohormonas y diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo.

Para lograr lo anterior se estableció un experimento en donde se probó el efecto de la sacarosa mediante la adición al medio de cultivo de 10, 20, 30, 40 y 50  $g\ l^{-1}$ . Se usó el medio MS adicionado de los suplementos descritos en el apartado 3.4 más 1  $mg\ l^{-1}$  de 6-bencilaminopurina (BAP).

Se tuvieron nueve repeticiones por cada tratamiento estableciéndose en frascos Gerber<sup>MR</sup> con 25 ml de medio. Se usaron segmentos nodales de nim de 5 mm como explante, los cuales contenían una yema axilar de 1-2 mm de longitud.

Para probar el efecto de las citocininas, se seleccionó el mejor tratamiento de sacarosa obtenido en el experimento previo, el cual fué de 10  $g\ l^{-1}$ , y se estableció un experimento en el cual se probó la adición de 6-bencilaminopurina (BAP) y Cinetina (KIN) tanto solas como combinadas, dando un total de seis tratamientos que se describen en el Cuadro 5.

Se tuvieron seis repeticiones en frascos Gerber<sup>MR</sup> en dos fechas de siembra: el 1° de Junio y el 7 de Julio de 1992.

En ambos experimentos se tomaron datos semanalmente durante 60 días. se contó el porcentaje de explantes brotados y se estimó su tamaño; también se observó el porcentaje de frascos con formación de callo y su magnitud. El porcentaje de brotación y de callo fué obtenido mediante el conteo de los frascos con brotación y de frascos con callo, en relación con el total de repeticiones.

Cuadro 5. Concentraciones de las citocininas utilizadas en la evaluación de la multiplicación y crecimiento de yemas axilares de nim.

Tratamiento	Concentración ( $\text{mg l}^{-1}$ ) y fitoreguladores
1	1.0 BAP
2	5.0 BAP
3	1.0 KIN
4	5.0 KIN
5	0.5 BAP + 0.5 KIN
6	2.5 BAP + 2.5 KIN

Los brotes se midieron empleando una regla graduada, midiendo exclusivamente la yema axilar o el brote generado a partir de ésta, es decir que las mediciones realizadas no representan el tamaño total del explante, sino el del brote ó yema. La magnitud del callo se registró con una escala arbitraria visual. Otras observaciones que se efectuaron fueron el origen de los brotes (adventicio o axilar) y el vigor de los mismos.®

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 3.8 Enraizamiento

Este experimento se planteó con el objetivo de encontrar una combinación adecuada de reguladores del crecimiento para lograr un buen enraizamiento de brotes.

Se probaron cuatro tratamientos formados por la adición de  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de uno de los tres fitoreguladores siguientes: ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), y ácido naftalenacético (ANA). También se tuvo un tratamiento control el cual carecía de reguladores del crecimiento. Estos tratamientos se colocaron en dos medios de cultivo idénticos excepto por el estado

físico ya que unos fueron sólidos y otros líquidos.

Se tuvieron ocho repeticiones de cada tratamiento, los cuales se establecieron en tubos de cultivo de 125 x 25 ml con 12 ml de medio de cultivo. El medio de cultivo empleado fue el que se describe en la sección 3.4 con sus vitaminas pero sin adicionar citocininas.

Se utilizaron como explantes brotes de yemas axilares de 5 mm de longitud, obtenidos en el experimento de multiplicación a partir de segmentos nodales, a los cuales se les separó el brote.

Se tomaron datos periódicamente durante 60 días cuantificando el tamaño del brote, número de hojas y el porcentaje de callo. Los datos se analizaron estadísticamente bajo un diseño completamente al azar.

No se cuantificó el enraizamiento debido a que los tratamientos evaluados no fueron capaces de inducir el proceso de formación de raíces.

---

### UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

#### 3.9 Morfogénesis

Se investigó la morfogénesis *in vitro* del nim como un método alternativo de clonación de plantas, dadas las dificultades actuales en México para conseguir semilla para propagación, y sobre todo, pensando en el potencial de la técnica para selección de germoplasma superior en adaptación y contenido de los principios activos involucrados en el control de insectos plaga.

Se utilizaron tres diferentes tipos de explantes estableciéndose en tres medios de cultivo distintos. La combinación de éstos dos factores dió como resultado nueve tratamientos y cada uno contó con 10 repeticiones (Cuadro 6).

Cuadro 6. Tratamientos evaluados para la inducción de callos y regeneración de plantas a partir de diferentes explantes y reguladores del crecimiento.

T ratamiento	Explante	Cantidades ( $\text{mg l}^{-1}$ ) y Regulador del crecimiento
1	Sección de hoja	0.5 2,4-D + 0.05 BAP
2	Sección de hoja	0.5 BAP + 0.5 ANA
3	Sección de hoja	Control
4	Sección de peciolo	0.5 2,4-D + 0.05 BAP
5	Sección de peciolo	0.5 BAP + 0.5 ANA
6	Sección de peciolo	Control
7	Sección de tallo	0.5 2,4-D + 0.05 BAP
8	Sección de tallo	0.5 BAP + 0.5 ANA
9	Sección de tallo	Control

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se utilizaron frascos Gerber<sup>MR</sup> que contenían 25 ml de medio de cultivo y se colocaron dos explantes por frasco. Cada explante fue considerado como una unidad experimental y tenían originalmente un tamaño de 1 cm para secciones de tallo y peciolo y 1 cm<sup>2</sup> para secciones de hoja.

El método de desinfección consistió en introducir los explantes en una solución de Cloralex<sup>MR</sup> al 20% durante un tiempo de inmersión de 20 minutos para el caso de los tallos y peciolos, y de una concentración de Cloralex<sup>MR</sup> en solución al 10% durante 10 minutos, para el caso de las hojas, debido a la mayor sensibilidad de este tejido a la concentración del desinfectante.

Se utilizó el medio de cultivo MS (1962) adicionado de 0.4 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg l<sup>-1</sup> de mio-inositol y 1 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina, además de los reguladores de crecimiento descritos en el Cuadro 6.

Se efectuaron observaciones periódicas durante cinco meses con énfasis especial cuando se apreciaron cambios significativos. Las observaciones realizadas durante el transcurso del experimento fueron sobre la contaminación de los cultivos y cambios en los explantes como: inducción de callo, crecimiento, arrugamiento de hojas, enraizamiento y brotación.

### 3.10 Propagación por estacas

Se evaluó la respuesta a la brotación y enraizamiento de estacas de tallo semileñosas obtenidas a partir de árboles de tres años de edad y cortadas en tres diferentes épocas del año: Febrero, Junio y Agosto. En cada época se cortaron 100 estacas de 20 ó 26 cm de longitud y de 1 a 2 cm de grosor y se removieron las hojas, se humedeció la base del tallo y se impregnó de enraizador comercial Rootone<sup>MR</sup>.

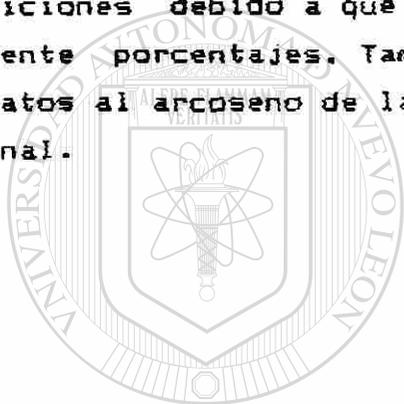
Las estacas fueron plantadas en dos ambientes de cultivo: unas en cajas de propagación con perlita como sustrato y colocadas en el invernadero, y las otras se establecieron directamente en el terreno del vivero. El invernadero utilizado no contaba con un control de temperatura por lo que normalmente se encontraba 4°C por encima de la temperatura externa.

Se registraron datos sobre los porcentajes de brotación, enraizamiento y sobrevivencia. La brotación fue evaluada antes de los 30 días y a los 30, 60 y 90 días.

El enraizamiento fue registrado únicamente en estacas de invernadero por la facilidad que proporcionó la perlita para extraer las estacas sin dañar el sistema radicular. Este dato se

tomó sólo al término del experimento (90 días después de la siembra DDS) para no estar sacando las estacas continuamente. En vivero el dato fue estimado tomando como base el porcentaje de sobrevivencia, asumiendo que las plantas muertas carecían de raíz, lo anterior sólo fue comprobado en las estacas del invernadero.

Se realizó un análisis de varianza para los porcentajes de brotación y enraizamiento comparando los dos ambientes de cultivo (invernadero y vivero), bajo un diseño completamente al azar; y considerando los datos de diferentes meses o épocas como repeticiones debido a que no se contó con datos individuales sino solamente porcentajes. También por esta razón se transformaron los datos al arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje original.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Establecimiento aséptico

Los resultados obtenidos en los experimentos de establecimiento aséptico en las dos fechas de siembra se muestran en el Cuadro 7, y los promedios de los efectos principales, en el Cuadro 8. El análisis de varianza pudo detectar diferencias estadísticas significativas al nivel de 0.05 para las concentraciones de Cloralex<sup>MR</sup>, pero no pudo detectar para tiempos de inmersión, ni interacciones (Cuadro 9). Sin embargo se discutirán las diferencias numéricas entre los tres tiempos de inmersión así como la interacción observada.

Al comparar las dos épocas de establecimiento se pudo observar que hubo cierta diferencia entre sus promedios (Cuadro 8). En Noviembre se tuvo un promedio general de 66.8% de contaminación mientras en Septiembre se tuvo la mayor presencia de patógenos con un 83.2% de recipientes contaminados.

Los resultados anteriores parecen tener relación con las condiciones climáticas prevalecientes en el campo al momento de la colecta de baretas ya que en Noviembre de 1992, la temperatura promedio en Marín N. L. fue de 16°C, es decir una de las más bajas del año (Cuadro 3), y sabemos que las temperaturas bajas limitan el desarrollo de microorganismos, en tanto que las temperaturas altas como las de septiembre (28°C en promedio) promueven el crecimiento de patógenos, esto pudiera explicar en parte los resultados obtenidos.

Al comparar la contaminación en los tratamientos con 5, 10 y 20% (v/v) de Cloralex (Cuadro 8 y 9) se detectó diferencia significativa entre tratamientos, en donde el mejor fue el uso de la concentración al 20% con un 54.5% de contaminación. Las otras dos concentraciones utilizadas fueron iguales estadísticamente (5 y 10%) con un 86.9% y 68.2% de contaminación respectivamente.

Cuadro 7. Porcentajes de contaminación de segmentos nodales de *nim* al ser sometidos a varios tratamientos de desinfección en dos fechas de siembra<sup>1</sup>.

Cloralex <sup>MR</sup> (%)	Tiempo (min)	Época de establecimiento	
		Septiembre	Noviembre
5	5	75	100
5	10	87	100
5	20	100	100
10	5	100	100
10	10	87	50
10	20	87	38
20	5	87	38
20	10	63	38
20	20	63	38

<sup>1</sup> Datos obtenidos del promedio de siete y ocho observaciones.

### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El *nim* parece ser una especie con alta sensibilidad a la presencia de patógenos, ya que otras especies tienen menos requerimientos para su desinfección como es el caso del orégano, con el cual Carriles (1994) obtuvo un 100% de asepsia a partir de ápices jóvenes usando Cloralex<sup>MR</sup> al 5, 10 y 20%; aunque una diferencia notable es que en tal investigación se usaron explantes de menor grosor, lo cual favorece la asepsia.

Cuadro 8. Promedios de contaminación de segmentos nodales de nim establecidos en tres épocas, sometidos a diferentes concentraciones de Cloralex<sup>MR</sup> y tiempos de inmersión<sup>1</sup>.

Epoca de siembra	Contaminación (%)
Septiembre	83.2
Noviembre	66.8
Cloralex <sup>MR</sup> (%)	
5	86.9 a <sup>2</sup>
10	68.2 ab
20	54.5 b
Tiempo de inmersión (min)	
5	85.7
10	70.8
20	59.3

<sup>1</sup> Datos obtenidos a partir de 72 observaciones.

<sup>2</sup> Valores con letras distintas indican diferencia estadística.

En cuanto a los tiempos de inmersión de los explantes, se observó que con 5 minutos de inmersión, se obtuvo un 85.7% de contaminación promedio y que al aumentarlo a 10 y 20 minutos, se redujo a 70.8 y a 59.3% respectivamente. Se recomienda el uso de 20 minutos de inmersión porque se tiene la menor contaminación.

Cuadro 9. Análisis de varianza del porcentaje de contaminación de segmentos nodales de ním sometidos a diferentes tratamientos de desinfección.

FV	GL	CM	F	P>F	
Factor A	2	1687.765625	7.1760	0.014	*
Factor B	2	254.097656	1.0804	0.381	N.S.
Interacción	4	361.273438	1.5361	0.271	N.S.
Error	9	235.195313			
Total	17				

C. V. = 23.44%

Aún y cuando el análisis de varianza no detectó diferencia para la interacción, visualmente se aprecia una interacción entre la época de establecimiento y la concentración de Cloralex<sup>MR</sup> (Cuadro 7), sobre todo en la siembra realizada en Noviembre, la cual muestra una clara tendencia a disminuir la contaminación al aumentar la concentración de Cloralex<sup>MR</sup> lo cual no ocurrió durante el mes de Septiembre.

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los resultados parecen indicar que es posible seguir incrementando la concentración de Cloralex<sup>MR</sup> y el tiempo de inmersión de los explantes para obtener una mejor asepsia, sin embargo esto no puede hacerse en forma indefinida debido a que los tejidos vegetales son sensibles a su acción pudiendo causar quemaduras. En este caso con el tratamiento más severo de 20% de Cloralex<sup>MR</sup>, no causó este tipo de daño.

Con base en lo anterior, se puede integrar que el mejor tratamiento se obtuvo con el establecimiento del cultivo en Noviembre y usando una concentración de Cloralex<sup>MR</sup> al 20% (v/v)

durante 5 minutos de inmersión ó más; con ésta técnica se tuvo un 38% de contaminación. Se podría tratar de reducir la contaminación mediante el uso de vacío, como lo sugiere Ojeda (1993) para semillas de *Astrophytum capricorne* para tener una mejor penetración de Cloralex<sup>MR</sup>, ó bien se pudiera implementar una doble desinfección (Brown, 1979).

#### 4.2 Multiplicación

En relación con el efecto de la sacarosa sobre la brotación y formación de callo, el Cuadro 10 muestra una brotación entre un 33 y 76% de los explantes. Se obtuvo un mejor porcentaje de brotación al usar 10  $g\ l^{-1}$  de sacarosa y el resto de los tratamientos parecen ser muy similares. Lo anterior no coincide con el promedio general de cultivos *in vitro*, los cuales usan normalmente 30  $g\ l^{-1}$  de sacarosa, que dan un medio de cultivo con con -5 bares de potencial osmótico ó -0.5 mPa (Alvarado, comunicación personal).

Lo ocurrido aquí puede explicarse como un requerimiento específico para esta especie, que rompe el letargo de las yemas con altos potenciales hídricos (cerca de cero) los cuales son obtenidos al usar bajas concentraciones de sacarosa. No se midió el potencial hídrico del medio con 10  $g\ l^{-1}$  de sacarosa pero de acuerdo a experiencias anteriores se estima en -3 bares.

Se pudo apreciar también que la concentración de sacarosa modificó la consistencia de los medios, ocasionando un efecto secundario al del estrés hídrico, con el uso de 40 y 50  $g\ l^{-1}$  se tuvo una mayor consistencia (firmeza y penetración). De cualquier manera se sabe que la cantidad de agar es la principal responsable de ésta característica deseable en un medio de cultivo (Deberg, 1983).

Cuadro 10. Brotación y formación de callo de yemas axilares de nim en un medio con diferentes concentraciones de sacarosa<sup>1</sup>

Sacarosa ( $g l^{-1}$ )	Brotación (%)	Callo Magnitud <sup>2</sup>
10	76	+
20	33	+
30	33	++
40	43	++
50	40	++

<sup>1</sup> Valores obtenidos de nueve observaciones a los 60 días después de la transferencia.

<sup>2</sup> Escala de magnitud: + leve, ++ medio, +++ abundante

Todos los tratamientos formaron callo, siendo ligeramente superior en magnitud al usar 30, 40 y 50  $g l^{-1}$  de sacarosa.

En relación con el experimento sobre reguladores del crecimiento (Cuadro 11), se observó que en todos los tratamientos se produjo un 100% de brotación, con excepción del tratamiento con 5  $mg l^{-1}$  de KIN, el cual tuvo un 83%. Esto muestra que las yemas de nim son capaces de brotar en presencia de diversas concentraciones de citocininas en el medio de cultivo. Las yemas axilares de nim respondieron rápido, obteniéndose las primeras respuestas visibles a los siete días después del establecimiento.

En relación con el crecimiento de los brotes, se aprecia una diferencia numérica entre tratamientos.

En todos los tratamientos existió formación de callo en los brotes, éste varió entre un 50 y 100% de los brotes y aparentemente la combinación de los dos fitoreguladores dieron los resultados más elevados, éste comportamiento no puede atribuirse

exclusivamente a los reguladores del crecimiento adicionados exógenamente pues desafortunadamente no se tuvo un tratamiento testigo para observar la formación de callo sin fitoreguladores.

Se puede suponer que en el caso del nim, la inducción de callos en medios con y sin fitoreguladores exógenos, puede estar relacionado con el nivel endógeno de los mismos (Weaver, 1976).

Cuadro 11. Efectos de dos citocininas en la brotación y formación de callo de yemas axilares de nim<sup>1</sup>.

Trat.	Descripción (mg l <sup>-1</sup> )	Brotación		Callo	
		(%)	Longitud (mm)	(%)	Magnitud <sup>2</sup>
1	1.0 BAP	100	19	100	++
2	5.0 BAP	100	5	50	+
3	1.0 KIN	100	12	83	+
4	5.0 KIN	83	11	50	++
5	0.5 BAP + 0.5 Kin	100	6	100	+
6	2.5 BAP + 2.5 Kin	100	6	100	++

<sup>1</sup> Datos obtenidos a las nueve semanas, promedio de 12 observaciones en dos épocas de siembra.

<sup>2</sup> Escala de magnitud: + leve, ++ medio, +++ abundante.

La formación de callo es indeseable en muchos cultivos *in vitro* ya que es generador de variabilidad genética, y la energía que se usa va en detrimento del crecimiento del brote. Sin embargo, se deben buscar otras alternativas que promuevan más el

crecimiento de brotes y eviten la inducción de callo; posiblemente las giberelinas pudieran ser útiles.

#### 4.3 Enraizamiento

Los resultados del experimento de enraizamiento se presentan en el Cuadro 12. Se muestran sólo los datos de longitud del brote, el número de hojas y el porcentaje de callo, pero no se presentan porcentajes de enraizamiento debido a que los explantes evaluados en los medios con diferentes auxinas no formaron raíces.

Cuadro 12. Tamaño de brote, número de hojas y porcentaje de callo obtenidos en brotes axilares de nim, establecidos en medios sólidos y líquidos con diferentes auxinas<sup>1</sup>

Auxina (mg l <sup>-1</sup> )	Longitud de Brote (mm)	Nº de Hojas	Callo (%)
Medio sólido			
1 AIA	8.7 A <sup>2</sup>	2.5	100
1 AIB	7.7 AB	2.5	100
1 ANA	9.0 A	2.3	100 <sup>®</sup>
Control	6.4 B	1.1	100
Medio líquido			
1 AIA	8.8 A	2.6	100
1 AIB	8.2 A	3.0	96
1 ANA	7.0 A	2.5	100
Control	8.5 A	3.0	100

<sup>1</sup> Datos promedio de ocho repeticiones a los 72 días después de la transferencia.

<sup>2</sup> Las medias con la misma letra no son diferentes entre sí estadísticamente al nivel de significancia de 0.05 según la prueba de DMS.

Aparentemente el nim presenta limitaciones para iniciar el proceso de rizogénesis, ya que las auxinas utilizadas son las más comunes para enraizamiento *in vitro* e *in vivo*, aunque en éste caso sólo se hayan usado a una sola dosis ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) que tal vez fué insuficiente.

La falta de enraizamiento *in vitro* se asemeja a lo observado en vivero e invernadero, en donde al usar estacas para propagación adicionadas de enraizador comercial el porcentaje de enraizamiento obtenido fué bajo, y en el mejor de los casos fué de un 27%. Sin embargo, en el trabajo de morfogénesis a partir de callos de nim que se describe en la siguiente sección, sí se tuvo abundante formación de raíces, aunque éstas fueron generadas por un proceso muy distinto.

Se encontró diferencia significativa entre tratamientos en medio sólido, para longitud de brotes, en donde las auxinas ANA y AIA tuvieron brotes más largos que el control. Con ANA los brotes midieron 9 mm y con AIA 8.7 mm en promedio. En el medio líquido no se encontró diferencia significativa entre tratamientos (Cuadro 13).

En el medio líquido, el tratamiento con  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA también mostró buen crecimiento (8.8 mm), lo cual parece indicar su efecto favorable, aunque en otras especies como el orégano, el comportamiento de éste fitoregulador fué igual al tratamiento control sin reguladores del crecimiento (Carriles, 1994).

Con relación al número de hojas, no se realizó un análisis estadístico, pero visualmente se observa poca variación entre tratamientos fluctuando entre una y tres hojas. Lo anterior indica poca respuesta en ésta variable a la presencia de auxinas exógenas. En promedio, el experimento en medio líquido tuvo mayor número de hojas que el de medio sólido.

Al igual que en los tratamientos de multiplicación, la presencia de callo fué bastante notoria y abundante, sobre todo en la parte basal del explante, encontrándose de 96 a 100% de explantes con callo. Esto era de esperarse, ya que se sabe que las tres auxinas anteriores, e incluso la falta de ellas induce la desdiferenciación del tejido.

Cuadro 13. Análisis de varianza para longitud de brotes de nim al emplear tres fitoreguladores adicionados a medios sólidos y líquidos.

Medio sólido						
FV	GL	CM	F	P>F	Signific.	
Tratamientos	3	9.464274	4.4915	0.012	*	
Error	24	2.107142				
Total	27					

C.V. = 18.23%

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Medio líquido

FV	GL	CM	F	P>F	
Tratamientos	3	4.702433	2.6871	0.068	NS
Error	24	1.748995			
Total	27				

C.V. = 16.17%

Debido a los resultados obtenidos, es conveniente continuar buscando otros factores promotores del enraizamiento. Un ejemplo, puede ser el empleo de carbón activado, que ayuda a fijar sustancias que se forman como desecho en algunos medios de cultivo. Otro factor importante puede ser la adición de aminoácidos, tal como lo hizo Tonin (1981) citado por Martínez (1992) quien promovió la morfogénesis óptima de raíces en explantes de hoja en frijol, usando el medio MS adicionado de 60  $\text{mg l}^{-1}$  de arginina y 50  $\text{mg l}^{-1}$  de ácido aspártico, además de 10  $\text{mg l}^{-1}$  de caseína. Por último, también sería recomendable probar el empleo de diferentes dosis de auxinas e inclusive combinándolas entre sí; además de la reducción en la concentración de sales inorgánicas (Gutiérrez, 1988).

#### 4.4 Morfogénesis

Con el tratamiento de esterilización superficial usado, se tuvo una excelente asepsia (100%) en los explantes de hoja y peciolo, caso contrario ocurrió con los explantes de tallo, en donde la contaminación fue de un 100% a los 12 días después de la transferencia. Esta diferencia de contaminación entre explantes y los resultados de los experimentos de establecimiento aséptico (descritos en la sección 4.1), en donde en el mejor de los casos se tuvo un 38% de contaminación en éste mismo tipo de explante, nos indica que el tallo requiere de un tratamiento de desinfección más severo para su establecimiento aséptico. Es poco probable que éste tratamiento cause daño al explante, considerando que el tallo está compuesto de tejidos más leñosos y resistentes que las hojas.

Los cambios observados en los explantes de nim durante el desarrollo del experimento se muestran en el Cuadro 14. La primera respuesta obtenida se presentó a los 12 días después de la transferencia (DDT) siendo diferente para los tipos de explante, pero no para los medios utilizados. Las secciones de hoja mostraron primero un ondulamiento que se volvió más pronunciado

y se amplió al 100% de las unidades experimentales, a los 28 días. A los 50 DDT se obtuvo la formación de callos en el 100% de los explantes.

En el caso de los pecíolos, éstos tuvieron un aumento en grosor como respuesta inicial a los 12 DDT para después alargarse e iniciar la formación de callo en el 100% de los explantes a los 28 DDT. Posteriormente, a los 50 DDT se generalizó la formación de callo al 100% de los explantes, y luego ya no sufrieron cambio alguna en el resto de los 140 días que duró el experimento.

La mayor rapidez en la formación de callo en las secciones de peciolo comparado con las secciones de hoja, ya se ha observado en otras especies como el frijol (Brown y Thorpe, 1980).

Los cambios visibles más significativos relacionados con la morfogénesis de novo de nim ocurrieron a los 105 DDT que fue cuando se definió la incapacidad del peciolo para diferenciar órganos en cualquiera de los medios utilizados; mientras que los callos obtenidos de secciones de hoja, sufrieron cambios aparentemente dependientes de los reguladores del crecimiento adicionados al medio de cultivo. El tratamiento adicionado con  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de 2,4-D y  $0.05 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP, no sufrió cambios a los 140 DDT, lo cual parece congruente considerando el conocimiento existente de que el 2,4-D es un fitoregulador de uso más generalizado para la inducción y mantenimiento de callos (Weaver, 1976).

Al usar secciones de hoja como explante, el tratamiento adicionado con  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP +  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA y el tratamiento control, fueron los únicos inductores de la morfogénesis de novo la cual se manifestó a los 105 DDT en todas las repeticiones en donde los callos tuvieron un abundante crecimiento y además formaron protuberancias granulares y aparentemente independientes unos de otros, lo que hace suponer que el proceso involucrado sea embriogénesis somática.

Quadro 14. Cambios observados en los explantes de nim durante su morfogénesis.<sup>1</sup>

TRATAMIENTO	CANTIDAD DE REGULADOR DE CRECIMIENTO (mg l <sup>-1</sup> )	EXPLANTE	DIAS DESPUES DE LA TRANSFERENCIA				
			12	28	50	105	140
1	0.5 2,4-D + 0.05 BAP	HOJA	INICIO DE ONDULA MIENTO	100% DE ONDULA-MIENTO Y CRECI-MIENTO	100% DE CALLO MAGNITUD <sup>2</sup> ++	100% CALLO MAGNITUD <sup>2</sup> +++	CALLO 100% MAGNITUD <sup>2</sup> +++
2	0.5 BAP + 0.5 ANA	HOJA				PROVIERE-RANCIAS GRANULA-RES 100%	75% BROTES 100% RAICES
3	CONTROL	HOJA					75% BROTES 100% RAICES
4	0.5 2,4-D + 0.05 BAP	PECIOLA					
5	0.5 BAP + 0.5 ANA	PECIOLA	ENGROSA MIENTO	100% DE ALARGA-MIENTO Y 100% DE INICIO DE CALLO.	100% DE CALLO MAGNITUD <sup>2</sup> +		SIN CAMBIO
6	CONTROL	PECIOLA					

<sup>1</sup> Datos obtenidos de 10 observaciones.

<sup>2</sup> Escala de magnitud: + leve, ++ medio, +++ abundante.

En esta misma fecha inició la emergencia de brotes y raíces. No parece haber una diferencia entre éstos dos tratamientos, ni incluso a los 140 DDT en donde se incrementó el número de explantes con brotes y raíces así como el tamaño de estos.

El uso mezclas de BAP y ANA como inductores de la morfogénesis *de novo* fue reportado en 1985 por Narayan y Jaiswal (1985) quienes usaron éstos mismos fitoreguladores en varias concentraciones logrando obtener regeneración de plántulas de nim. Ellos encontraron enraizamiento en todas las concentraciones de ANA probadas (0.05 A  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$ ), pero la que indujo mayor número de raíces (3-5 por cultivo) en un mayor porcentaje de cultivos ( $50.0 \pm 7.3\%$ ) fue la de  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  a los 28 días. La concentración anterior es la misma que se probó en el presente estudio. Con la concentración de  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$ , el enraizamiento se redujo drásticamente.

Narayan y Jaiswal (1985) también mencionan que el uso de BAP a concentraciones de 0.05 a  $1 \text{ mg l}^{-1}$ , favoreció el crecimiento de brotes. El porcentaje de cultivos con formación de brotes fue  $54.1 \pm 7.5$  máximo en la concentración de  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP, pero en concentraciones mayores se redujo la brotación. Al combinar esta concentración de BAP con diversas concentraciones de ANA (0.05, 0.1, 0.5 y  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$ ) los autores citados encontraron que debajo de  $0.05 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA el porcentaje de brotación se incrementaba en relación al BAP solo; pero concentraciones mayores de  $0.05 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA en combinación con BAP eran inhibitorias de la formación de brotes

La combinación probada en el presente experimento ( $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BAP y  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  ANA) con bastante éxito, no produjo brotes ni raíces en el trabajo de Narayan y Jaiswal (1985). Esto puede atribuirse a que ellos subcultivaron a las seis semanas, mientras que en el presente trabajo las primeras respuestas morfogénicas se presentaron a los 105 días.

Más recientemente, en 1993, Shrikande y Colab. señalaron que el proceso morfogénico involucrado en la micropropagación de nim es la embriogénesis somática, y que éste se presentó en su máxima expresión a las 18 semanas de la transferencia al medio, lo cual soporta en gran medida la asunción anterior.

En el caso del tratamiento control, pareciera parcialmente incongruente su comportamiento observado, el cual es muy similar al del tratamiento 2, ya que es bien conocido que en varias especies la ausencia de fitoreguladores induce enraizamiento, lo cual se ha comprobado en *Polygonum* (Carriles, 1994) y en *Saintpaulia* (Alvarado, comunicación personal).

Los resultados de éste trabajo acrecentan la factibilidad de que al mejorar la técnica de micropropagación incluyendo las etapas aclimatación y transferencia al suelo, se tenga un método práctico de propagación del nim *in vitro* a gran escala, con mayor tasa de multiplicación que los métodos convencionales.

#### 4.5 Propagación por estacas

Los datos obtenidos en vivero e invernadero sobre la propagación por estacas se muestran en el Cuadro 15. Los datos de enraizamiento real sólo se obtuvieron de las estacas en invernadero ya que en las estacas del vivero se asumió que la sobrevivencia estaba asociada con la producción de raíces.

El análisis de varianza (Cuadro 16) no detectó diferencia estadística entre tratamientos para enraizamiento; pero sí detectó diferencia significativa en cuanto a la brotación. La comparación de medias muestra que el mejor ambiente para la siembra de estacas de nim fué el invernadero.

Cuadro 15. Porcentajes de brotación, enraizamiento y sobrevivencia de estacas de nim establecidas en tres épocas del año de 1993 en dos ambientes.

Fecha de corte y siembra	Brotación				Enraizamiento y/o sobrevivencia a los 90 días después de la siembra.
	Días después de la siembra				
	<30	30	60	90	
<b>Invernadero</b>					
Febrero	0	34	34	34	0
Junio	52	52	52	52	1
Agosto	57	61	61	61	27
<b>Vivero</b>					
Febrero	-	-	19	19	15
Junio	-	24	24	24	0
Agosto	21	21	21	21	4

El enraizamiento de estacas también está influenciado por la existencia de ciertos cofactores del enraizamiento que permiten un crecimiento más acelerado de las raíces. Pero también Weaver (1976) menciona que existen muchos otros cofactores presentes en las hojas que ayudan al enraizamiento, éstos pueden ser azúcares y materiales nitrogenados o algunos compuestos fenólicos como el ácido cafeico, el catefol y el ácido clorogénico que interactúan con las auxinas al inducir la iniciación de raíces. Por otra parte, también existen inhibidores endógenos que al encontrarse en concentraciones elevadas pueden detener el efecto de las sustancias promotoras presentes.

De hecho, la velocidad de brotación de las estacas también fue más rápida en el invernadero que en el vivero. Esto fue quizás debido a que las altas temperaturas activaron la brotación. Esto lo fundamenta Hartman (1980) quien menciona que las mejores temperaturas para la propagación por estacas fluctúa entre 21 y 27 °C durante el día, y alrededor de 15° durante la noche; y estas temperaturas son similares a las que tenía el invernadero con el cual se trabajó.

En invernadero hubo una mayor brotación en Agosto que en Junio y Febrero. En general, el enraizamiento fue bajo, incluso cero o cercano a cero en dos de las fechas de siembra en invernadero y vivero. En el invernadero solo en la fecha de Agosto se obtuvo un buen porcentaje de enraizamiento relativo (27%); de hecho éste fue el valor más alto de todo el experimento.

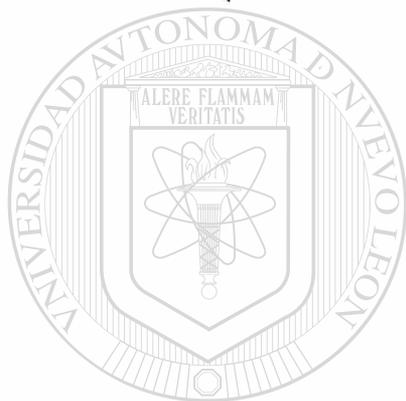
Las temperaturas excesivamente altas promueven el desarrollo de la yema antes que el desarrollo radicular e incrementan las pérdidas de agua por las hojas. Es importante que la raíz se desarrolle primero que las yemas, por eso es recomendable mantener la temperatura más alta en la base de la estaca que en la parte superior.

Algunos de los factores determinantes para el enraizamiento son la luz y la temperatura; ésta última puede afectar directamente la respiración de la estaca provocando que las reservas sean reducidas en un tiempo más rápido de lo que son las respuestas, y aún cuando la luz sea suficiente para una ganancia fotosintética neta (Hartman y Kester, 1980).

En niveles bajos de luz obtenidos por el sombreado, las estacas con grandes áreas foliares pueden compensar un nivel de fotosíntesis bajo (por unidad de área), sin embargo, en grandes áreas foliares pueden ser perjudiciales en sistemas donde la pérdida de agua y la temperatura son altas, ya que tales estacas perderán más agua que aquellas con áreas foliares pequeñas.

En general, los resultados denotaron un porcentaje bajo de enraizamiento, la causa principal de lo anterior puede ser atribuida a la especie. Hartman (1980) menciona que existe un número elevado de plantas y variedades que tienen reducido porcentaje de prendimiento por estacas, lo cual es una condición intrínseca de la especie ó que aún no se ha determinado con exactitud sus requerimientos específicos para el enraizamiento por estacas.

El éxito relativo logrado en la siembra de Agosto señala que la especie puede responder favorablemente bajo ciertas condiciones específicas de manejo y ambiente.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## V. CONCLUSIONES

Con base en los objetivos generales y específicos planteados, y en los resultados obtenidos bajo las condiciones en las que se desarrolló esta investigación, y a la discusión de los mismos se derivan las siguientes conclusiones:

El análisis de varianza detectó diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de Cloralex<sup>MR</sup> obteniéndose la menor contaminación con el uso de 20% (v/v) de Cloralex<sup>MR</sup>. No se detectó diferencias entre los tiempos de inmersión ni en las interacciones entre éstos dos factores para el establecimiento aséptico de segmentos nodales de nim; sin embargo, numéricamente se obtuvieron los mejores resultados colectando las baretas y estableciendo los explantes en el mes de Noviembre y usando Cloralex<sup>MR</sup> al 20% (v/v) con una inmersión durante 5 minutos ó más.

Las concentraciones de sacarosa 10, 20, 30, 40 y 50  $gl^{-1}$  adicionados al medio de cultivo promueven la brotación de yemas axilares *in vitro*, pero el mayor porcentaje de nuevas brotadas se obtuvo con la adición de 10  $gl^{-1}$  de sacarosa.

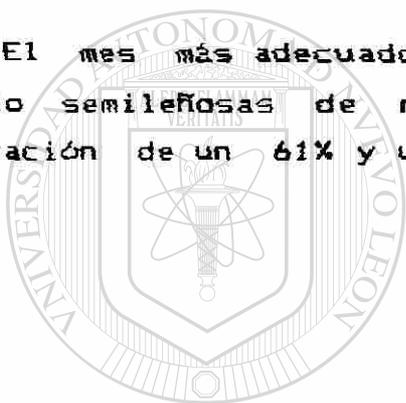
La adición al medio de 0.5, 1, 2.5 y 5  $mg l^{-1}$  de 6-bencilaminopurina y kinetina promovieron la brotación de yemas axilares.

Los tratamientos evaluados de 1  $mg l^{-1}$  de ácido naftalenacético, 1  $mg l^{-1}$  de ácido indolbutírico, 1  $mg l^{-1}$  de ácido indolacético adicionados al medio de cultivo, y un tratamiento control que no contenía reguladores del crecimiento, no fueron capaces de promover la formación de raíces *in vitro* en medios sólidos y líquidos.

El tratamiento control sin reguladores del crecimiento fue capaz de inducir morfogénesis de *novos* a los 105 días después de la transferencia, produciéndose un efecto similar con la adición de  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP y  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA al medio de cultivo. Dicha morfogénesis fue obtenida exclusivamente en explantes de hoja, previo paso por formación de callo y se manifestó como formación de brotes y raíces. Con el uso de pecíolos como explante, sólo se formó callo en el 100% de los contenedores.

El invernadero propició condiciones ambientales que favorecieron la brotación de estacas más que la siembra directa en vivero.

El mes más adecuado para la colecta y siembra de estacas de tallo semileñosas de *nim* fue Agosto, en el cual se logró una brotación de un 61% y un enraizamiento de 27% en invernadero.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## VI. BIBLIOGRAFIA

Ahmed, S. and M. Grainge. 1985. The use of indigenous plant resources in rural development. *International Journal for Development Technology*. 3:123-130.

Alvarado G., O. G. 1990. Caracterización *in vitro* de la tolerancia de *Chenopodium quinoa* Willd a la salinidad (NaCl). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 104p.

Anónimo, 1987. El utilísimo Neem. *Agricultura de las Américas*. Mayo-Junio. pp 28-34.

Atrni, S.S. and R. Prasad. 1980. Studies on the pesticidal value of neem oil by products. *Pestology IV*: 16-20.

Bailey, L. H. 1977. *Manual of Cultivated Plants*. Mc Millan Publishing Co. Inc. New York. pp 612-613.

Berlijn, I. J. 1982. *Fruticultura*. S.E.P. Trillas. México. 285 p.

Brown, D. C. W. 1979. Osmotic requeriment for shoot formation in tobacco callus. *Physiol. Plant*. 46:36-41.

Brown, D. C. W. and T.A. Thorpe. 1980. Changes in water potential and its components during shoot formation in tobacco callus. *Physiol. Plant*. 49:83-87.

Calderón A., E. 1977. *Fruticultura General, el esfuerzo del hombre*. Limusa. México. 759 p.

- Carriles G., R. 1994. Propagación en vitro de orégano *Poliomintha longiflora* Gray. Tesis. Ingeniero Agrónomo Fitotecnista. Facultad de Agronomía, U.A.N.L. Marín, N.L. 40 p.
- Cooping, L. G. and P. Rodgers. 1985. Biotechnology and its Application to Agriculture. British Crop Protection Council. BCP Publ. Cryodon, England. 62 p.
- Deberg, P.C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.* 59:270-276.
- Dixon, R. A. 1985. Plant Cell Culture. A Practical Approach. IRL Press Oxford. 43 p.
- Font, Q. R., 1974. Botánica Pintoresca. Ed. Ramon Sopena, España. 190 p.
- Fuller, N. W. and J. R. Gallon. 1985 Plants products and the new Technology. Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. Clarendon Press. Oxford. 78 p.
- García, E. 1973. Modificación al sistema climático de Koppen para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. 2a ed. Instituto de Geografía, UNAM. 245 p.
- Garza V., P. 1987. El árbol insecticida Neem, *Azadirachta indica* A. Juss, para el control de plagas y el desarrollo rural en México. Tesis. Ingeniero Agrónomo Fitotecnista. Facultad de Agronomía, U.A.N.L. Marín, N. L. 27 p.
- Grunberg, I.P. y E. Sartori, 1968. El Arte de Criar e Injertar Frutales. Ed. Universidad de Buenos Aires. 139 p.

- Gutierrez E., M. A. 1988. Efecto de benciladenina, ácido indolacético, niveles de agar y carbón activado en la micropropagación de piña (*Ananas comosus* L) cultivar cayena lisa. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 112 p.
- Halfacre, R. G. y J. A. Barden. 1984. Horticultura. A. G. T. Editor, México. 727 p.
- Hammett, K. R. W. 1984. Estructuración de la copa, poda y cirugía de árboles. Ed. Diana. México. 135 p.
- Hartman, H. T. y D. E. Kester. 1980. Propagación de Plantas. C.E.C.S.A. México. 812 p.
- Hidalgo, C. H. 1983. Estudio Preliminar sobre el enraizamiento de estacas de pimienta negra en Tezonapa, Ver. Tesis FAUANL. 74 p.
- Huang, L., R. Van Gundy and T. Murashige. 1985. Plant Tissue Culture. Fundamentals and Applications. University of California. Riverside. 66 p.
- Hurtado, D. y M. E. Merino. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales Trillas. México. 230 p.
- Iracheta D., L. 1993. Evaluación *in vitro* de brotes de frijol para la determinación de tolerancia a sales de NaCl. Tesis. FAUANL. 69 p.
- Jacobson, M., J. B. Stokes, and J. D. Warthen. 1983. Neem research in the U. S. Department of Agriculture. An up date (USDA). Proc. 2nd Int. Nim Conf. pp 31-42.
- Jeques, H.E. 1946. How to Know the Trees. Ed. WMC Brown Company Publishers. OIwa. U.S.A. 109 p.

- Jotwani, M. G. and P. Sircar. 1965. Neem seed as protectant against stored grain pests infesting wheat seed. *Indian J. Entomol.* 27:160-164.
- Ketkar, C. M. 1977. Utilization of Neem and its products. *The Oils and Oilseeds Journal.* 24 (3): 6.
- Kramer, S. 1982. *Fruticultura.* Ed. CECSA. México. 276 p.
- Kyte, L. 1983. *Plants from tubes. An Introduction to Micropropagation.* Timber Press. Portland, Oregon.
- Lagunes T., A. y C. Rodriguez. 1989. *Busqueda de Tecnología Apropriada para el Combate de Plagas del Maíz Almacenado en Condiciones Rústicas.* CONACYT y CP. Proyecto PVT/AI/NAL/85/3149. Período Noviembre de 1985 a Noviembre de 1988. México. p 2-6.
- Le Baron, H.M., R.O. Muma, R.C. Honeycutt, J.H. Duesing, J.F. Phillips, and M. J. Hass. 1987. *Biotechnology in Agricultural Chemistry* American Chemical Society. Washington, D. C. 155p
- Leos M., J. y R. Salazar S. 1992. El árbol insecticida neem (*Azadirachta indica* A. Juss). Folleto técnico # 3. Facultad de Agronomía, U.A.N.L. Marín, N.L. 30 p.
- Leos M., J.; R.P. Salazar S.; and O. G. Alvarado G. 1994. Introduction on the neem tree in México, *in vitro* propagation and validation of its properties against stored product insects. In: *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Working Conference on Stored Product Protection.* Canberra, Australia. April 1994.

- Martínez A., F. 1992. Regeneración *in vitro* de 4 genotipos de frijol a partir de brotes apicales. Tesis Ingeniero Agrónomo Fitotecnista. Facultad de Agronomía. U.A.N.L. Marín, N.L. 71 p.
- Murashige, T. 1987. A Syllabus of Laboratory Exercises in Agricultural Applications of Plant Tissue Culture. University of California. Riverside. 45 p.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-479.
- Narayan, P. and V. S. Jaiswal. 1985. Plantlet regeneration from leaflet callus of *Azadirachta indica* Juss. *J. Tree Sci.* 4(2):65-68.
- Ojeda Z., C. 1993. Técnicas de desinfestación y micropropagación de *Astrophytum capricorne*. Tesis. Ingeniero Agrónomo Fitotecnista. Facultad de Agronomía, U.A.N.L. Marín, N.L. 68 p.
- Rodríguez S., E. E. 1986. Propagación *in vitro* del limón Mexicano. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 110 p.
- Shrikhande M., S., R. Thengane, and A. F. Mascarenhas. 1992. Somatic Embryogenesis and plant regeneration in *Azadirachta indica* A. Juss. *In Vitro. Cell. Dev. Biol.* p 38-42.
- Snedecor, B. W. y W. G. Cochran. 1971. Métodos Estadísticos. Ed. continental. México. pp 405-405, 683-685.
- Stein, U. and M. P. Parrella. 1985. Seed extract shows promise in leafminer control. *California Agriculture. Jul-Ago.* pp 19-20.

Street, H.E. 1973. *Plant Tissue and Cell Culture Application to Crop Improvement*. Berkeley. 155 p.

Thorpe, T.A. 1978. *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Intl. Assoc. Plant Tissue Culture: Calgary. 126 p.

Villalobos A., V. 1985. *Fundamentos Teórico-Prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales*. Colegio de Postgraduados, Chapingo México. 115 p.

Washington International Center, 1985. *International Exchange News Neem: the pesticide Tree*. 30 (1): 5, 9-10.

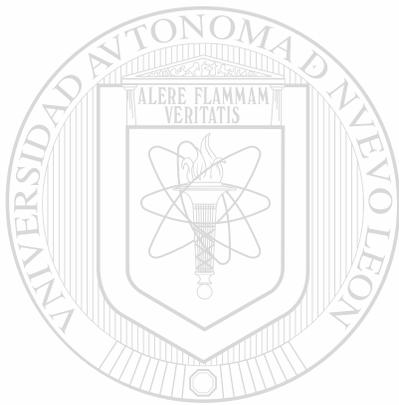
Weaver, R. J. 1976. *Reguladores del Crecimiento de las Plantas en la Agricultura*. Ed. Trillas. México. 350 p.

Whinters, L. A. and J. T. Williams. 1982. *Crop Genetic Resources. The Conservation of Difficult Material*. Paris. 78 p.

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



VII. APENDICE

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Figura 1A. Ramas con hojas y frutos del nim.**



Figura 2A. Distribución mundial del mín.

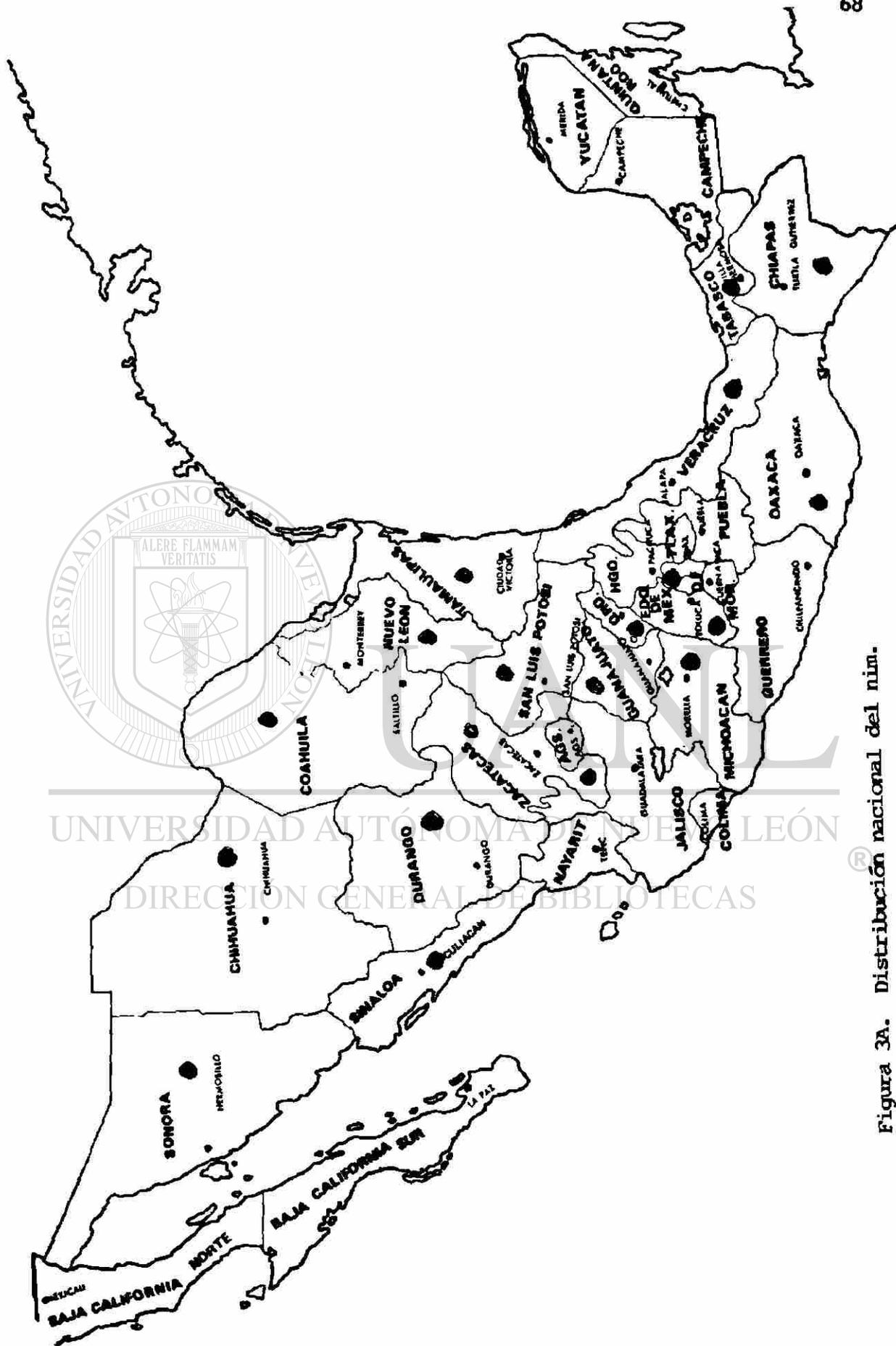


Figura 3A. Distribución nacional del nim.



Jabón

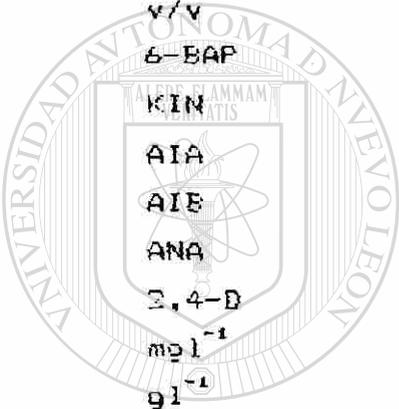


Pasta dental

Figura 4A. Jabón y pasta dental fabricados a base de aceite de nim.

Cuadro 1A. Significado de las abreviaturas utilizadas en el presente escrito.

Abreviatura	Significado
MS	Murashige y Skoog
MR	Marca registrada
v/v	volumen / volumen
6-BAP	6-bencilaminopurina
KIN	kinetina
AIA	ácido indolacético
AIB	ácido indolbutírico
ANA	ácido naftalenacético
2,4-D	ácido 2,4 diclorofenoxiacético
mg l <sup>-1</sup>	miligramos por litro
g l <sup>-1</sup>	gramos por litro
mPa	micropascales
mm	milímetros
ml	mililitros
msnm	metros sobre nivel del mar



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

C



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

