

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Conkal



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL

MÉTODOS ALTERNOS DE PROPAGACIÓN DEL ÁRBOL RAMÓN (*Brosimum alicastrum*)

TESIS

Que presenta:

JOSÉ MANUEL CASTILLO CHUC

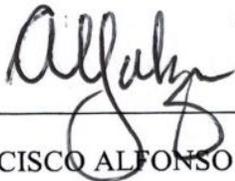
Como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGRONOMÍA

**Conkal, Yucatán, México
2018**

La presente Tesis fue realizada por José Manuel Castillo Chuc de la carrera de Ingeniería en Agronomía, con Orientación en Horticultura Tropical Protegida y con número de control 12800024, con el título: Métodos alternos de propagación del árbol Ramón (*Brosimum alicastrum*), la cual fue dirigida y revisada por el jurado que fue asignado en su oportunidad, y cuyos integrantes firman su consentimiento para que este trabajo sea presentado como requisito parcial para la titulación de acuerdo al proceso de Titulación Integral y al Manual de Lineamientos Académicos-Administrativos del Tecnológico Nacional de México.

DIRECTOR



DR. FRANCISCO ALFONSO LARQUÉ SAAVEDRA

ASESOR



DR. EDUARDO VILLANUEVA COUOH

ASESOR



DR. LUIS LEONARDO PINZÓN LÓPEZ

Conkal, Yuc., mayo 2018

DEDICATORIAS

A mi familia, en especial a mis padres, Darwin y Wilma, por el gran sacrificio que han hecho por mis hermanos y por mí a lo largo de la carrera y durante el proceso de titulación.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico de Conkal, por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios en sus instalaciones.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, a través del Banco de Germoplasma, por haber prestado sus instalaciones para el desarrollo del proyecto de tesis.

Al Dr. Alfonso Larqué Saavedra, por permitirme realizar la tesis bajo su dirección, por su tiempo, comentarios, observaciones y sugerencias para la realización de la misma.

Al Dr. Eduardo Villanueva Couoh, por su co-asesoría en la elaboración del presente trabajo, por sus comentarios, revisiones y observaciones en el desarrollo de la misma.

Al Dr. Luis Leonardo Pinzón López, por su apoyo, la revisión y por sus valiosos comentarios y sugerencias en el desarrollo de la tesis.

Al M.C. Rodolfo Martín Mex, Ángel Nexticapan, Garcés y Fernando Contreras por la orientación y asesoría brindadas en las primeras etapas de la tesis.

A Silvia Vergara Yoisura, por todo el apoyo técnico y administrativo desde el primer momento que estuve en el grupo de trabajo del ramón.

Al M.C. Carlos Sandoval, por ser mi coach y enseñarme técnicas valiosas en el cultivo de tejidos vegetales; a la M.C. Candelaria Pérez Martín y al I.B.Q. Israel García Sheseña por su apoyo en el transporte diario al Banco de Germoplasma y por sus comentarios en la etapa experimental de la tesis.

A mis compañeras de tesis y de laboratorio, Karen Díaz y Ángela Aké, por su compañía, consejo, ayuda y sobre todo por su amistad.

A todos mis amigos, especialmente a mi mejor amigo Romario, Alipio, Bacab, Vianey, Pilar y Roger, por su grata compañía y ayuda en tiempos complicados, por sus palabras y por su humor; a mis compañeros de la Sociedad Científica de Dzán A.C, porque ellas y ellos también son fuentes de inspiración y lucha para lograr nuestras metas.

RESUMEN

El ramón (*Brosimum alicastrum*) es una especie nativa de los bosques tropicales del sureste de México que ha mostrado un enorme potencial por su producción de forraje y semillas para la alimentación humana y pecuaria. El presente estudio se desarrolló con el objeto de evaluar tres métodos de propagación vegetativa del ramón. Los métodos de propagación fueron: 1) estaca de tallo, 2) micropropagación por cultivo de tejidos, 3) injerto. Los resultados mostraron que es posible propagar esta especie mediante la técnica del injerto, mismo que prosperó en dos individuos, que después de ocho meses mostraron la aparición de 27 hojas con una área foliar total de 394.9 cm² y un tasa de crecimiento entre 0.2 cm y 1.3 cm al mes. No se obtuvieron resultados positivos a través del método de la estaca. La micropropagación no fue posible concluirlo durante los 10 meses que duró el estudio, sin embargo se avanzó en el sentido de obtener un 71.3 % de éxito en el establecimiento aséptico de los explantes utilizados, por el uso del tratamiento con alcohol al 70 % por 1 min. + hipoclorito de sodio al 15 % por 10 min. Dichos explantes vivos y libres de fenolización prosperaron y permanecieron tres meses en incubación en los tratamientos con 1 a 3 mg L⁻¹ de 6-BAP y de 1 a 3 mgL⁻¹ de Cinetina adicionados al medio de cultivo.

Palabras clave: Ramón (*Brosimum alicastrum*), injerto, estaca de tallo, micropropagación, fitohormonas.

ABSTRACT

Brosimum alicastrum Swartz (breadnut) is a native tree from the southern of Mexico that had shown a good potential for the forage and seed production for cattle and human uses. The present work was carried out with the aim to test three different clonal propagation methods for this tree. The plant propagation methods were: 1) cutting, 2) micropropagation *in vitro* and 3) grafting. Results show that is possible to propagate this specie by grafting, which developed in two individual plants and after eight months of growth show 27 leaves with 394.9 cm² of leaf area and growth rate of 0.2 cm to 1.3 cm per month. No positive results were obtained by cutting. Micropropagation was not possible finished after 10 month of this study; however, it was obtained 71.3 % on the success in the aseptic establishment of the explants by the treatment with alcohol 70 % for 1 minute + 15 % sodium hypochlorite for 10 minutes. The live explants free of phenolization have prospered and lived for a time of three months in incubation on the treatments which 1 to 3 mg L⁻¹ of 6-BAP and 1 to 3 mg L⁻¹ of Kinetin added to the culture medium.

Keywords: Breadnut (*Brosimum alicastrum*), grafting, cutting, micropropagation, plant hormone.

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
ÍNDICE DE TABLAS	11
ÍNDICE DE FIGURAS	11
1 INTRODUCCIÓN	13
2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS	14
2.1 Objetivo general	14
2.2 Objetivos específicos	14
2.3 Hipótesis	15
3 FUNDAMENTO TEÓRICO	15
3.1 Origen y distribución de <i>Brosimum alicastrum</i>	15
3.2 Importancia del ramón en México	17
3.3 Clasificación taxonómica	18
3.4 Descripción botánica	18
3.4.1 Planta	18
3.4.2 Raíz	19
3.4.3 Tallo	19
3.4.4 Hoja	19
3.4.5 Flor	20

3.4.6 Fruto	20
3.4.7 Semilla	20
3.5 Métodos de propagación asexual	20
3.5.1 Injerto.	21
3.5.2 Estaca de tallo	22
3.5.3 Cultivo de tejidos vegetales	22
3.5.4 Micropropagación	23
3.6 Reguladores de crecimiento vegetal	24
3.6.1 Auxinas	25
3.6.2 Citocininas	25
4 DESARROLLO DEL PROYECTO	26
4.1 Colecta de material	26
4.2 Selección de material	26
4.2.1 Selección de material para estacas de tallo	26
4.2.2 Selección de material para cultivo <i>in vitro</i>	26
4.2.3 Selección de material para injertos	27
4.3 Desinfección superficial de material para estaca e injerto	27
4.4 Desinfección superficial para cultivo <i>in vitro</i>	27
4.5 Tratamiento y diseño experimental en las estacas	28

4.6 Tratamiento y diseño experimental en cultivo <i>in vitro</i>	28
4.7 Tratamiento y diseño experimental en injertos	30
4.8 Toma de datos	31
4.8.1 Toma de datos en las estacas	31
4.8.2 Toma de datos en el cultivo <i>in vitro</i>	31
4.8.3 toma de datos en los injertos	31
4.8.3.1 Porcentaje de prendimiento del injerto	31
4.8.3.2 Altura del injerto	32
4.8.3.3 Número de hojas del injerto	32
4.8.3.4 Área foliar del injerto	32
4.8.3.5 Porcentaje de sobrevivencia del patrón	32
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1 Enraizamiento de estacas de tallo	33
5.2 Cultivo <i>in vitro</i>	34
5.2.1 Desinfección superficial	34
5.2.2 Efecto de los reguladores de crecimiento	37
5.3 Injerto	39
5.3.1 Prendimiento del injerto	39
5.3.2 Desarrollo de los injertos exitosos	40
	10

5.3.3 Número de hojas	41
5.3.4 Área foliar del injerto	44
5.3.5 Supervivencia del patrón	45
6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
8 ANEXOS	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos de desinfección para explantes de <i>Brosimum alicastrum</i> .	29
Tabla 2 Primera combinación (matriz 1) a dosis crecientes entre dos citoquininas para la inducción y proliferación de brotes adventicios en explantes de <i>Brosimum alicastrum</i> .	30
Tabla 3 Respuesta a los tratamientos de desinfección aplicados a explantes de <i>Brosimum alicastrum</i> .	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribución geográfica de <i>Brosimum alicastrum</i> en México.	16
Figura 2. Distribución de <i>Brosimum alicastrum</i> en la península de Yucatán.	17
Figura 3. Principales métodos de micropropagación.	23
Figura 4. Estacas de ramón 14 días después de la siembra.	34
	11

Figura 5 Explantes de <i>Brosimum alicastrum</i> después de tres meses de cultivo.	38
Figura 6. Altura de dos injertos de <i>Brosimum alicastrum</i> .	41
Figura 7. Desarrollo de un injerto de ramón de los 25 a los 155 días después de injertar	42
Figura 8. Floración en injerto de ramón.	43
Figura 9 Número de hojas en dos injertos de <i>Brosimum alicastrum</i> .	44

1 INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes retos actuales de la humanidad es garantizar la producción de alimentos para una población mundial en crecimiento, que de acuerdo a datos del Banco Mundial, aumentó un 39 % al pasar de 5,280 millones en el año 1990 a 7,300 millones en el 2015 y se espera que para el 2050 hayan 9,700 millones de habitantes. En México la población aumentó 48 % al pasar de 81.2 millones en 1990 a 121 millones de personas en el año 2015; se proyecta para el año 2030 una población de 131.2 millones de personas (INEGI, 2017; CONAPO, 2012), lo cual implica la necesidad de alimentar a un número creciente de personas, de tal manera que en los próximos años se tiene el reto de aumentar el volumen de producción de los alimentos a nivel mundial, pasando de las 8,400 millones de toneladas actuales a casi 13,500 millones de toneladas por año para el 2050 (FAO, 2017). En la actualidad México es dependiente en gran medida de la importación de granos para atender la demanda nacional. Según el FIRA, para el año 2016, esta importación ha sido del 36.2 % de maíz, 72 % de arroz y 55 % de trigo. Para afrontar esta demanda de alimentos se ha propuesto la incorporación del sector forestal para tal fin. El modelo propuesto recientemente, es el de utilizar un árbol dominante de la selva del trópico mexicano conocido con el nombre de ramón, que por su alta productividad podría ser un complemento importante para reducir la importación de granos.

El ramón (*Brosimum alicastrum*), es una especie dominante en la selva tropical mexicana y en Yucatán se ha reportado su potencial de aprovechamiento tanto de forraje como de semilla desde tiempos de los Mayas (Peters y Pardo, 1982); actualmente también se usa como planta de ornato y para la restauración de zonas degradadas (Hernández *et al.*, 2015; Montañez *et al.*, 2009; Morales y Herrera, 2009; Berg, 1972). Sin embargo pocos estudios existen respecto a la

propagación vegetativa de este árbol con el fin de dar preferencia a individuos con gran producción de semillas para plantaciones comerciales de ramón. La propagación vegetativa se ha utilizado desde hace siglos por el hombre para tener grandes cantidades de plantas útiles para su beneficio y sólo hasta la segunda mitad del siglo pasado se ha hecho uso de la técnica de cultivo *in vitro* como una alternativa de enfrentar los retos en temas de seguridad alimentaria en el presente siglo (Warschefsky *et al.*, 2016).

El presente trabajo de investigación forma parte del proyecto marco de Servicios Ambientales de *Brosimum alicastrum* que se lleva a cabo en la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, mismo que se ha hecho público en diferentes publicaciones (Larqué-Saavedra, 2011; Vergara *et al.*, 2014).

2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general

- Obtención de plantas seleccionadas de *Brosimum alicastrum* utilizando métodos alternativos de propagación vegetativa.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la técnica del injerto en la propagación de *Brosimum alicastrum*.
- Evaluar la técnica de propagación mediante estaca de tallo en *Brosimum alicastrum*.
- Valorar la primera etapa en la técnica de micropropagación en *Brosimum alicastrum*.

2.3 Hipótesis

- Es posible propagar el árbol ramón al menos por un método vegetativo.

3 FUNDAMENTO TEÓRICO

3.1 Origen y distribución de *Brosimum alicastrum*

El árbol ramón (*Brosimum alicastrum*), es nativo del sureste de México y gran parte de América central, aunque también se ha reportado su presencia en el oeste de Jamaica y Cuba (National Academy of Science, 1975). Los hábitats naturales de esta especie son los bosques perennifolios húmedos y lluviosos, selvas medianas subperennifolias, media subcaducifolia, alta perennifolia, alta subcaducifolia y palmar (Burns *et al.*, 1998; Pardo y Sánchez, 1980; Vega *et al.*, 2003).

En México se localiza desde el estado de Sinaloa hasta Chiapas, en la vertiente del pacífico, hasta unos 400 u 800 msnm, de Tamaulipas hasta Quintana Roo, en el litoral del Golfo de México y del mar Caribe, hasta una altitud de 600 msnm, también se reporta en gran parte de la planicie costera del Golfo hasta la península de Yucatán (Pennington y Sarukhan, 2005; Chavelas y Devall, 1988).

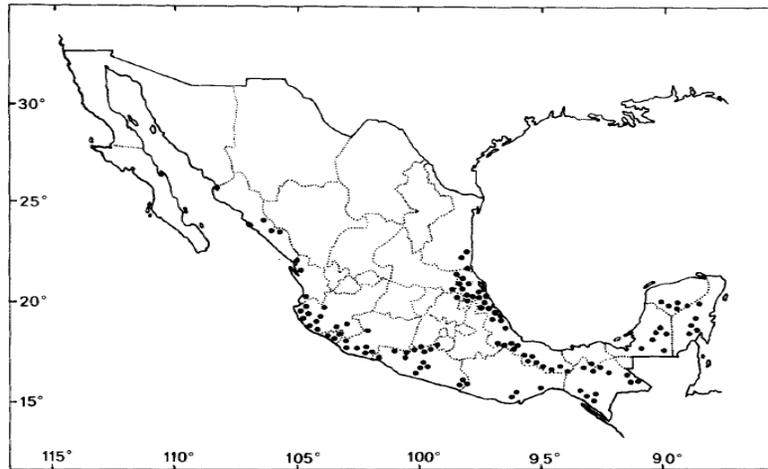


Figura 1 Distribución geográfica de *Brosimum alicastrum* en México. Pardo-Tejeda y Sánchez (1982).

En la península de Yucatán, esta especie se encuentra distribuida de forma natural en la parte central, sur y oriente (Morales y Herrera, 2009), formando parte de la composición de la selva baja subcaducifolia y selva mediana subcaducifolia, sin embargo, es muy común ver ejemplares en casi todo el territorio de la península, pues forma parte de los huertos familiares en la familia rural y además es muy reconocido como árbol de ornato en parques, avenidas y áreas verdes debido a su follaje perenne y a su valor nutricional como alimento para ganado vacuno y caprino, principalmente.

Según Rico-Gray *et al.*, (1985), el árbol ramón se adapta a suelos muy arcillosos, profundos e inundables en la época de lluvia, así como también a suelos someros y altamente pedregosos.

Este árbol está adaptado a crecer y regenerarse a partir de bosque cerrado, presentando las plántulas una fuerte tolerancia al sombreado (Peters, 1983; Overgaard, 1992).

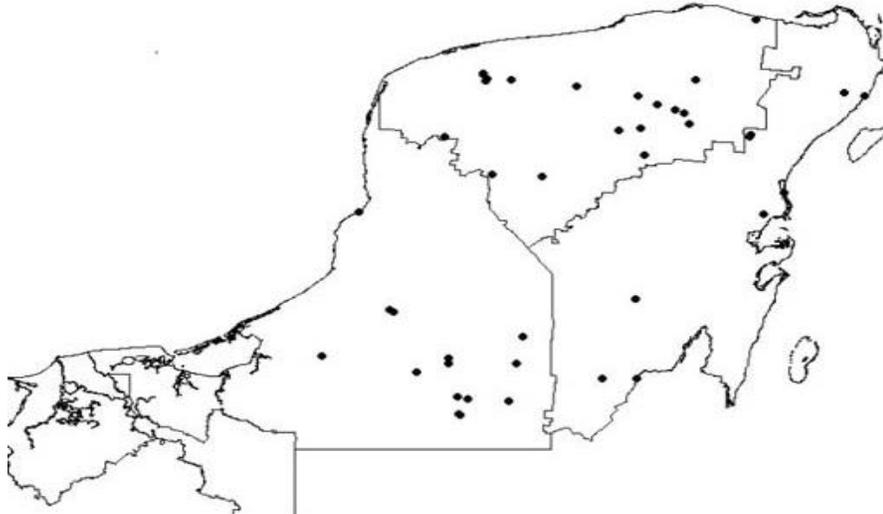


Figura 2. Distribución de *Brosimum alicastrum* en la península de Yucatán. Tomado de: flora digital península de Yucatán.

3.2 Importancia del ramón en México

Esta especie proporciona diversos servicios ambientales: protege el suelo y los cuerpos de agua; ayuda en la conservación de la biodiversidad y es una especie utilizada para la restauración ecológica (Hernandez *et al.*, 2015).

El árbol ramón ha sido objeto de múltiples estudios, entre ellos destacan su uso como forraje para ganado, del cual se aprovechan las hojas y las ramas tiernas (Pardo y Sánchez, 1980; Yañez *et al.*, 2010), su uso para la obtención de bioetanol (Huchin, 2015), y medicinal (Delgado, 2002; Barquera, 2013).

Actualmente uno de los usos potenciales que se ha reportado para el ramón es su incorporación en la cruzada nacional contra el hambre, (Larqué-Saavedra, 06 abril 2011), para

reducir la importación de granos en el país (Larqué-Saavedra, 6 de junio 2012) y su uso como una especie clave para la nueva revolución verde, debido a su productividad, que supera a muchas gramíneas como el maíz, trigo y arroz (Larqué-Saavedra, 17 mayo 2017).

3.3 Clasificación taxonómica

Según el Instituto Nacional de Biodiversidad (2017), la clasificación taxonómica del árbol ramón es la siguiente:

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rosales
Familia	Moraceae
Género	Brosimum
Especie	<i>Brosimum alicastrum</i> Swartz

3.4 Descripción botánica

3.4.1 Planta

Los árboles de ramón alcanzan hasta 45 m de altura y 1.5 m de diámetro en algunas selvas de Chiapas, Tabasco y Guatemala (Pennington y Sarukhán, 1998; Peters, 1989). En la península de Yucatán se ha reportado alturas que van de los 15 a los 22 m (Durán *et al.*, 2000). Presenta tronco con corteza lisa en árboles jóvenes; en los adultos, contrafuertes aparentes, de

corteza escamosa y suave que va de gris claro a gris pardo, en ocasiones café; además produce abundante látex blanco y pegajoso (Pennington y Sarukhán, 2005).

3.4.2 Raíz

Esta especie posee sistema radical fuerte, algunas raíces son superficiales y por este motivo el tronco trae contrafuertes bien marcados (Pennington y Sarukhán, 2005).

3.4.3 Tallo

De acuerdo con Salazar *et al.*, (2000) este árbol presenta fuste recto, cilíndrico y presenta de seis a diez contrafuertes grandes y bien formados. Corteza externa lisa en árboles jóvenes y escamosa en árboles adultos, parda grisácea, con tonos amarillentos, lenticelas redondeadas o más anchas que largas y con abundante exudado lechoso.

3.4.4 Hoja

Presenta hojas con láminas de 7 a 14 cm de largo, alternas y simples, de consistencia coriácea, forma ovalada, oblonga, incluso con forma lanceolada, con margen entero. Presenta coloración verde oscuro en el haz y verde grisáceo blanquecino en el envés, esto debido a la presencia de numerosas escamas bancas en el tejido de la nervadura. Son glabras en ambas superficies, con una nervadura sub marginal a lo largo de los bordes, ápice agudo acuminado, principalmente en las hojas jóvenes, la base es obtusa, aguda o truncada. Pecíolo corto, grueso, con estípulas puntiagudas que, al caer, deja una cicatriz que no rodea todo el tallo. En las axilas de cada pecíolo hay una yema florífera (Huchin, 2015).

3.4.5 Flor

Inflorescencias globosas que se forman en cabezuelas axilares de 1 cm de diámetro. Tienen pedúnculos de 1-5 mm de largo, glabros. Esta especie es monoica, con flores hermafroditas, y dioicos solo con flores femeninas. Las flores se producen en pares por cada axila, en ocasiones de tres a varias flores por axila (Morales y Herrera, 2009).

3.4.6 Fruto

De acuerdo a Rodríguez *et al.*, (2009), los frutos son drupas de aproximadamente 2.5 cm de diámetro y de color verde amarillento a rojizo cuando está completamente maduro. Constan de pericarpio y mesocarpio un poco carnoso, y presentan numerosas escamas blancas en la superficie de la cubierta.

3.4.7 Semilla

Huchin (2015), señala que las semillas del ramón son esféricas y aplanadas en ambos extremos, midiendo de 1.5 a 2 cm de diámetro, y presenta una testa papirácea amarillenta, con los cotiledones montados uno sobre otro.

La semilla fresca tiene de 45-55% de humedad, porcentaje de germinación es de 84 a 97.7% y el periodo de germinación va de 8 hasta 24 días. Las semillas se clasifican como recalcitrantes (Puente, 1995; Gillespie *et al.*, 2004).

3.5 Métodos de propagación asexual

La propagación por semilla tiene la desventaja de no heredar fielmente las características de la planta madre, es por eso que numerosos árboles frutales se propagan en las zonas tropicales

del mundo de manera vegetativa, práctica muy común, a través del injerto, estaca de tallo, estaca de raíz, acodo aéreo y la micropropagación, entre otros (Aralikatti, 2005).

De acuerdo a Hartman *et al.*, (2002), la capacidad de formar la estructura entera de una planta, se debe a dos propiedades únicas de las células vegetales que son la totipotencia celular (cada célula tiene la información genética necesaria para reconstituir todas las partes y funciones de la planta) y la dediferenciación celular (capacidad de las células de volver a una condición meristemática y desarrollar un punto de crecimiento nuevo).

Entre las grandes ventajas de estos métodos de propagación están su bajo costo, su clonación masiva, mejoramiento de la calidad del fruto, resistencia a ciertas enfermedades, mantener fenotipos deseados que permitan maximizar el rendimiento y escalamiento a niveles comerciales. (Bettinger *et al.*, 2009; Burdon *et al.*, 2008; Prad y Retournard, 2003).

3.5.1 Injerto.

Un injerto consiste en yuxtaponer una parte de una planta muy íntimamente sobre otra planta, que será el patrón del primero, en el cual ocurre una conexión vascular que dará como resultado una simbiosis entre el patrón y la rama injertada (Warschefsky *et al.*, 2016).

Esta técnica se ha usado desde tiempos antes de nuestra era y se usó por primera vez en especies como el olivo, higo y granada, (Mudge *et al.*, 2009) y actualmente es ampliamente usado en programas de propagación a escala comercial en todo el mundo, incluyendo más especies, sobre todo de la familia rosácea y rutácea.

Existen muchos reportes en la literatura sobre la propagación a través de injertos en varias especies de la familia Moraceae tales como *Artocarpus heterophyllus*, *Morus nigra*, y *Brosimum*

gaudichaudii (Maheswari y Nivetha, 2015; Zenginbal y Eşitken, 2016; Silva *et al.*, 2011), sin embargo, en la especie *Brosimum alicastrum* no se encontraron reportes sobre su propagación a través de injertos.

3.5.2 Estaca de tallo

En la propagación por estacas de tallo solamente es necesario que se forme un nuevo sistema de raíces adventicias.

La propagación de estacas de tallo se divide en cuatro grupos de acuerdo a la madera que se use: madera dura, madera semidura, madera suave, y herbáceas. En este método de propagación, se seleccionan segmentos de ramas que tengan yemas apicales o laterales, con la expectativa de que en las condiciones adecuadas formen raíces adventicias y así obtener plantas independientes (Hartman *et al.*, 2002).

En la literatura consultada solo se encontró un reporte de la propagación de ramón a través de estacas de tallo de uno a tres metros de longitud (Berg, 1972).

3.5.3 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales, también conocido como cultivo *in vitro*, es el cultivo aséptico de células, tejidos y órganos, aislados de una planta madre; y sus componentes bajo condiciones controladas de ambiente. Esta disciplina incluye una serie de técnicas y métodos usados dentro de muchas disciplinas botánicas y que tiene varios objetivos prácticos. (Bhojwani y Dantu, 2013; George *et al.*, 2008; Loyola y Ochoa, 2012).

3.5.4 Micropropagación

La micropropagación es una técnica del cultivo de tejidos vegetales, con etapas bien establecidas, en la cual se pueden producir un gran número de plantas en poco tiempo, y sirve para la conservación de especies en peligro de extinción; la inducción de la variación genética y la producción de plantas resistentes al estrés biótico y abiótico (Zaki, 2011).

Los principales métodos de micropropagación se muestran en la siguiente figura:

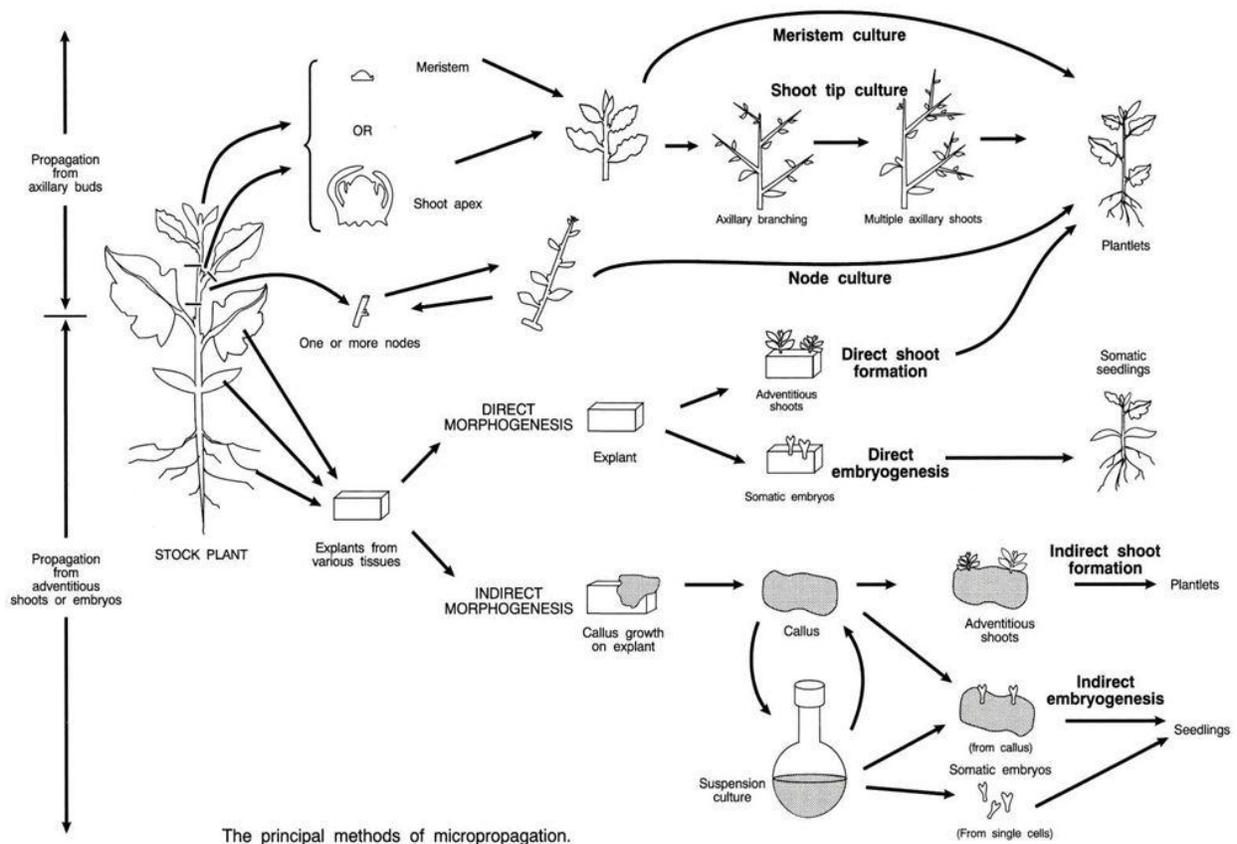


Figura 3. Principales métodos de micropropagación. Modificado de George *et al.*, (2008).

Se han hecho pocos estudios en la micropropagación con el ramón, destacando un reporte de Martínez (2013) señalando la germinación y posterior multiplicación *in vitro* a partir de semillas de ramón. En la familia de las moráceas se ha reportado la multiplicación *in vitro* para varias especies, destacando la mora (*Morus alba*, *Morus nigra*, *Morus indica*), la yaca (*Artocarpus altilis*) y el palo moral (*Macluria tinctoria*). (Gómez *et al.*, 2003; Murch *et al.*, 2007; Attia *et al.*, 2014; Choudhary, 2015).

La técnica del cultivo de tejidos a través de la micropropagación consta de cinco etapas, cada una con sus requerimientos y problemas específicos, estas etapas son: 0) Selección y preparación de la planta madre, 1) establecimiento del cultivo aséptico, 2) multiplicación 3) elongación y enraizamiento, 4) trasplante y aclimatación (Hussain *et al.*, 2012; George *et al.*, 2008).

3.6 Reguladores de crecimiento vegetal

A pesar de que el material vegetal *in vitro* contiene internamente algún tipo de fitohormona, normalmente es necesario adicionar al medio de cultivo algún regulador de crecimiento. Los reguladores de crecimiento cumplen un papel muy importante dentro de los cuales se encuentra la elongación del tallo, el tropismo y la dominancia apical (Bhojwani y Dantu, 2013).

Los reguladores de crecimiento vegetal son generalmente clasificados en cinco grupos: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. En el presente trabajo se mencionarán dos, por ser con los que se trabajaron durante los ensayos.

3.6.1 Auxinas

Las auxinas comprenden el grupo de reguladores de crecimiento vegetal más conocidos y, junto con las citocininas, son el tipo de reguladores más usados para el cultivo *in vitro* (George *et al.*, 2008, Bhojwani y Dantu, 2013).

La auxina más común encontrada en el tejido vegetal es ácido indoleacético (AIA), y los más usados en el cultivo *in vitro* son el ácido naftalenacético (ANA), ácido 3-indolbutírico (AIB), ácido 2,4diclorofenoxiacético (2,4 D) que son de origen sintético. Otros reguladores sintéticos usados actualmente son el ácido 4-clorofenoxiacético o ácido p-clorofenoxiacético (4-CPA, pCPA), ácido 2, 4,5-tricloro fenoxiacético (2, 4,5 T), ácido 3,6 dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba), ácido 4-amino 3, 5,6 tricloropicolínico (Saad y Elshahed, 2012; Aloni, 2004).

3.6.2 Citocininas

Es el otro mayor grupo de reguladores de crecimiento, el posible sitio de su síntesis es en la raíz de la planta. Se utiliza en el medio de cultivo para desencadenar un efecto de división celular, inducción de diferenciación de brotes adventicios a partir de callo y brotes axilares (George *et al.*, 2008).

Las citocininas comúnmente usadas en el cultivo de tejidos vegetales incluyen 6-Bencilaminopurina (BAP), 6-Dimetilaminopurina (2iP), 6-Furfuril aminopurina (cinetina), zeatina (6-4 hidroxil [3,2] metilenoil aminopurina), tiazuron (TDZ).

4 DESARROLLO DEL PROYECTO

4.1 Colecta de material

La colecta de material vegetal para hacer injertos, estacas y cultivo *in vitro* se realizó en el jardín botánico del Centro de Investigación Científica de Yucatán, ubicado en la ciudad de Mérida, Yucatán. Los árboles seleccionados tienen aproximadamente diez años de edad y fueron identificados como ejemplares hembra, con buena producción de semillas.

4.2 Selección de material

4.2.1 Selección de material para estacas de tallo

Las estacas que formaron parte del experimento se tomaron de la parte media del árbol y tenían entre 6 y 8 mm de diámetro y una longitud entre 10 y 15 cm, con presencia de yemas laterales, de acuerdo a la metodología descrita por Rivera *et al.*, (2016) y Hartman *et al.*, (2002).

4.2.2 Selección de material para cultivo *in vitro*

Yemas apicales laterales fueron recolectadas de la tercera parte superior de plantas de ramón. Las yemas, ahora referidos como explantes, se colocaron en agua destilada estéril, o envueltos en papel periódico húmedo, para su traslado y desinfección en el Banco de Germoplasma del Centro de Investigación Científica de Yucatán, ubicado en el Parque Científico Tecnológico de Yucatán.

4.2.3 Selección de material para injertos

Ramas laterales de la parte media del árbol, referidas ahora como estacas, fueron seleccionadas para hacer los injertos. Las estacas fueron injertadas el mismo día de su corte o se resguardaron a temperatura ambiente, previa desinfección superficial, hasta una semana antes de injertar.

4.3 Desinfección superficial de material para estaca e injerto

Las estacas fueron cortadas en secciones de 15 a 20 cm y puestas en agua destilada por 30 minutos. Posteriormente las estacas fueron sumergidas por 40 minutos en una solución fungicida (Switch[®] 2.5 g L⁻¹, regulador de pH Buffex[®] 1 g L⁻¹, y coadyuvante Helper[®] 2 mL L⁻¹).

El material usado para injertar tuvo el mismo proceso de desinfección y ambos tratamientos para desinfectar se hicieron de acuerdo a lo propuesto por Silva *et al.*, (2011) y Rivera *et al.*, (2016).

4.4 Desinfección superficial para cultivo *in vitro*

Siguiendo la metodología estándar recomendada por Pradhan (2010) y Attia (2014), los explantes se lavaron tres veces con agua del grifo, con el fin de remover polvo y material indeseado. Posteriormente fueron cortados en piezas de 1-1.5 cm y se les dio un enjuague con agua destilada estéril y tween 20, seguido de dos enjuagues con agua destilada estéril. En la campana de flujo laminar se hizo la desinfección superficial con alcohol al 70 % por dos minutos y diferentes concentraciones (10, 15 y 20 % de volumen) de hipoclorito de sodio (NaClO) a dos intervalos de tiempo (10 y 15 min.). Los explantes esterilizados se enjuagaron de cuatro a cinco veces con agua destilada estéril antes de su siembra.

4.5 Tratamiento y diseño experimental en las estacas

El sustrato utilizado fue agrolita y peatmoss® previamente esterilizados (1:1), el sustrato se puso en contenedores de plástico de 15x14x13 cm posteriormente se llevaron a una germinadora marca Binder a 27°C con humedad relativa entre 60 % y 80 % y fotoperiodo de 16 horas luz y ocho horas de oscuridad.

Para promover la formación de raíces, se siguió la metodología descrita por Hartman *et al.* (2002) y se utilizó un tratamiento de ácido-3-indolbutírico (0; 1,000; 3,000; 5,000; y 10,000 ppm [i.e., mg L⁻¹]), y un tiempo de exposición al regulador entre 10 y 15 segundos antes de su siembra en un diseño completamente al azar con 16 repeticiones por tratamiento.

4.6 Tratamiento y diseño experimental en cultivo *in vitro*

Esta etapa consistió en dos partes, el ensayo sobre desinfección superficial y el ensayo para evaluar las combinaciones de dos citoquininas.

Medio de cultivo: Se utilizó el medio M.S (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa (30 g L⁻¹), carbón activado (3 g L⁻¹), ácido cítrico (100 mg L⁻¹) adicionado con vitaminas de Gamborg y glicina (2 mg L⁻¹).

Adicionalmente algunos ensayos se hicieron con una mezcla de conservante vegetal (Plant Preservative Mixture® [1.5 mL L⁻¹]) con el fin de disminuir la contaminación endógena por bacterias y hongos en los explantes.

El medio de cultivo se dosificó en cajas magenta y se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C a 1.5 kg cm⁻² de presión. Se sembró un explante por caja magenta y se mantuvieron a 27±2°C de temperatura y fotoperiodo de 16 h.

Los tratamientos de desinfección se hicieron con base a lo propuesto por Murch (2007) para una especie de la familia de las moráceas. En la Tabla 1 se aprecian las concentraciones del desinfectante usado.

Tabla 1. Tratamientos de desinfección para explantes de Brosimum alicastrum. Cada combinación tuvo cinco repeticiones.

Tratamiento	Descripción
T1	Alcohol al 70% + cloro al 10% x 10 min.
T2	Alcohol al 70% + cloro al 15% x 10 min.
T3	Alcohol al 70% + cloro al 20% x 10 min.
T4	Alcohol al 70% + cloro al 10% x 15 min.
T5	Alcohol al 70% + cloro al 15% x 15 min.
T6	Alcohol al 70% + cloro al 20% x 15 min.

Nota: el porcentaje de cloro es a base de volumen/volumen (v/v), se usó blanqueador comercial Clorox® (5.25%) (NaClO).

Para inducir a la organogénesis, meristemos laterales y apicales fueron cultivados bajo combinaciones entre dos citoquininas (cinetina y 6-Bencilaminopurina), respectivamente la dosis usadas responden a las utilizadas en otros trabajos hechos con moráceas (Pradhan, 2010; Choudhary, 2015; Vijayan, 2011).

El ensayo se repitió dos veces en cada matriz con las combinaciones de reguladores, la dosis y combinación utilizada se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2 Primera combinación (matriz 1) a dosis crecientes entre dos citoquininas para la inducción y proliferación de brotes adventicios en explantes de Brosimum alicastrum.

		6-BAP (mg L ⁻¹)						
		0	0.5	1	2	4	5	6
Cinetina (mg L ⁻¹)	0	A	B	C	D	E	F	G
	1	H	I	J	K	L	M	N
	2	Ñ	O	P	Q	R	S	T
	3	U	V	W	X	Y	Z	a
	5	b	c	d	e	f	g	h

Los explantes fueron cambiados de medio cada tres semanas, durante 15 semanas, hasta la toma de datos de las variables.

4.7 Tratamiento y diseño experimental en injertos

El injerto se hizo mediante la técnica del injerto de púa tipo hendidura reportado por Maheswari (2015) en *Artocarpus heterophyllus*, el cual consiste en insertar la vareta en el patrón, haciendo una hendidura en este; después se debe apretar la unión del injerto para garantizar un mayor área de contacto entre injerto y patrón.

Se hicieron lotes de 25 injertos a la semana, de febrero a mayo del 2017, se hizo un total de 400 repeticiones. Los patrones fueron plantas desarrolladas a partir de semillas, contaban con ocho meses de edad al inicio del experimento y promedio de diámetro a 5 cm de la base de 5

mm. Los injertos fueron cubiertos con una bolsa de plástico con el fin de evitar su deshidratación y se resguardaron en invernadero a $32 \pm 5^{\circ}\text{C}$ de temperatura hasta la toma de datos.

4.8 Toma de datos

4.8.1 Toma de datos en las estacas

La toma de datos se hizo por apreciación visual a los 21 y 30 días después de iniciar el experimento. De acuerdo a Rivera *et al.*, (2016) las variables a considerar fueron: la formación de raíces, callo y formación de hojas y brotes nuevos.

4.8.2 Toma de datos en el cultivo *in vitro*

Para el tratamiento de desinfección superficial, se contó el porcentaje de desinfección después de dos semanas en observación, esto se hizo mediante el conteo directo de los explantes que no mostraron contaminación por hongos o bacterias.

Con los explantes libres de contaminación, se hizo la siembra de acuerdo a la matriz con las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento.

4.8.3 toma de datos en los injertos

4.8.3.1 Porcentaje de prendimiento del injerto

El porcentaje de prendimiento del injerto se determinó de acuerdo al número total de injertos que tuvieron éxito en formar una nueva planta. Se hicieron lotes de 25 repeticiones a la semana durante cuatro meses. La toma de datos se hizo un mes después de injertar contando directamente los injertos que fueron exitosos de los que no.

4.8.3.2 Altura del injerto

Se midió la altura de los injertos exitosos cada dos semanas, desde el tercer mes hasta el octavo mes después de injertar, se tomó la altura total del injerto desde el suelo hasta el ápice terminal del injerto con un flexómetro marca KNOVA.

4.8.3.3 Número de hojas del injerto

El número de hojas del injerto se contabilizó de forma visual cada dos semanas, desde el tercer mes hasta el octavo mes después de injertar, esto se contaron las hojas completamente desarrolladas al día de la toma de los datos.

4.8.3.4 Área foliar del injerto

El área foliar se midió una vez al mes durante tres meses, cuando el injerto tenía cuatro, cinco y seis meses de edad. Para medir el área foliar se utilizaron hojas en blanco, dibujando los bordes de las hojas sobre el papel, posteriormente se recortaron y se pasaron por un medidor de área foliar marca LICOR BIOSCIENCE mod. Li-3100C.

4.8.3.5 Porcentaje de sobrevivencia del patrón

Ese porcentaje de sobrevivencia se obtuvo al final de los ensayos, cuando se contó el número de patrones muertos se dividió entre el número de patrones que seguían vivos, independiente de si el injerto fuese exitoso o no.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Enraizamiento de estacas de tallo

En ninguno de los tratamientos probados se logró obtener desarrollo de raíces a partir de las estacas que permitiesen plantear que podrían obtenerse plántulas a partir de las estacas. Debe de agregarse que en todos los casos se pudo apreciar que, a pesar de los tratamientos de desinfección, las estacas se contaminaban. Los datos aquí obtenidos no soportan lo reportado en la literatura de que es posible lograr plantas a partir de estacas como lo señalan Hartman *et al.*, (2012). Estos resultados son diferentes de lo reportado por Silva *et al.*, (2011) en estacas de raíces de *Brosimum gadichaudii*, que muestra un porcentaje de enraizamiento entre 30 % y 50% utilizando AIB como enraizador. Por otra parte, Pio *et al.*, (2008) reportan un porcentaje de enraizamiento del 87% en *Ficus carica*, sin embargo, no mostraron desarrollo de parte vegetativa.

Diversos autores (Majada *et al.*, 2011; Muñoz *et al.*; 2009; Ruiz *et al.*, 2005) señalan que las dosis de auxinas varían en la respuesta a la estaca de acuerdo a la edad y estado fisiológico de la planta madre, época del año o la región de la estaca en la planta, en este experimento las estacas fueron de plantas de al menos ocho años de edad, con sexo definido, lo cual quizá indique que la planta ya está en un estado maduro y por eso no se observaron raíces.

En resumen se puede reseñar que siete días después de la siembra de las estacas se observó la aparición de hongos en la base de las yemas axilares de la estaca, pese a la aplicación de fungicidas semanalmente, después de 21 días la contaminación por hongos era el principal problema con las estacas. A los catorce días después de la siembra, se observaron algunas estacas con hojas nuevas, esto debido posiblemente que la planta consumía sus reservas, también debido

a la humedad dentro de la germinadora. Las hojas nuevas no terminan su desarrollo y después de una semana en la estaca, éstas abortaron. Después de un mes, no se observaron diferencias entre ninguno de los tratamientos y se dio por terminada esta etapa experimental.

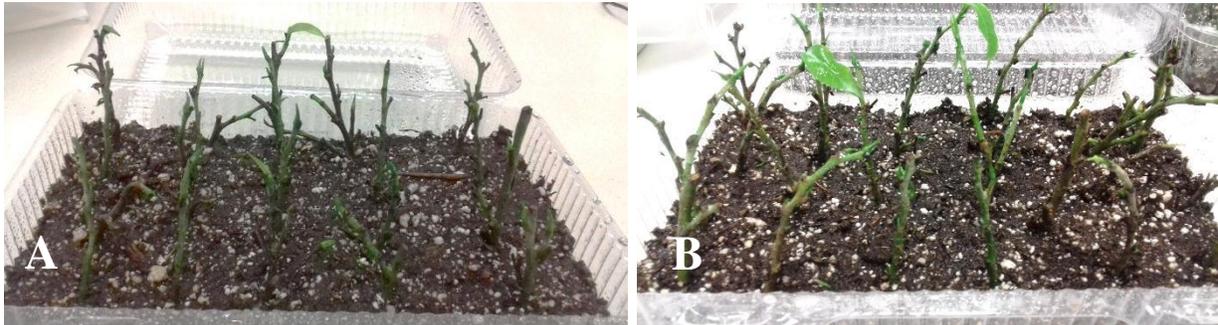


Figura 4. Estacas de ramón 14 días después de la siembra. A) Tratamiento testigo mostrando la aparición de una hoja. B) Tratamiento con 1,000 ppm de AIB. Ambos tratamientos abortaron sus hojas después de 21 días.

5.2 Cultivo *in vitro*

Una de las limitantes de mayor relevancia en este método de propagación es lograr las condiciones asépticas que aseguren la no contaminación del material que se desea propagar por esta técnica. Los resultados de esta parte experimental del presente estudio se reseñan a continuación:

5.2.1 Desinfección superficial

Todos los ensayos que se llevaron a cabo demandan partir de material biológico lo menos contaminado posible. Los ensayos hechos para saber cuál método de desinfección superficial es el más efectivo demuestran que los explantes tomados al aire libre muestran un gran porcentaje de contaminación (hasta 100 %), a pesar de los pretratamientos propuestos por otros autores

(Pradhan, 2010; Zaki, 2011; Attia, 2014). En el presente estudio el manejo del material biológico se llevó a cabo en forma inicial con explantes transportados en agua destilada estéril con fungicida en el traslado de material vegetal hasta el Banco de Germoplasma.

Los tratamientos de desinfección mostraron que las dosis de cloro que fueron de 10 % a 15 % y en tiempos de 10 a 15 minutos fueron los mejores para una adecuada desinfección superficial, mostrando porcentajes máximos de desinfección el tratamiento dos (71.3 %), seguido del tratamiento cuatro (48 %), comparados con los tratamientos cinco y seis, donde los explantes sufrieron daños químicos debido al cloro (Tabla 3).

Tabla 3 Respuesta a los tratamientos de desinfección aplicados a explantes de Brosimum alicastrum. Los porcentajes de desinfección constan de 40 repeticiones por tratamiento.

Tratamiento	Descripción	Porcentaje de desinfección	Observaciones
1	Alcohol 70 % por 1 min.+ cloro al 10 % por 10 min.	18 %	Sin daño a los explantes
2	Alcohol 70 % por 1 min.+ cloro al 15 % por 10 min.	71.3 %	Sin daño a los explantes
3	Alcohol 70% por 1 min.+ cloro al 20 % por 10 min.	82 %	Explantes con daños por cloro
4	Alcohol 70% por 1 min. + cloro al 10% por 15 min.	48 %	Sin daño a los explantes
5	Alcohol 70% por 1 min. + cloro al 15 % por 15 min.	86 %	Explantes con daños por cloro
6	Alcohol 70 % por 1 min.+ cloro al 20% por 15 min.	88 %	Explantes con daños por cloro

Los resultados obtenidos señalan que los explantes de ramón vienen con una fuerte carga de microorganismos, como reporta Huchim (2015), presentándose problemas de hongos y bacterias; así mismo concuerda con Enjalric *et al.*, (1988) quienes afirman que el grado de contaminación está determinado por las condiciones ambientales, por su parte Bhojwani y Dantu (2013), señalan que tener la planta madre bajo condiciones de invernadero reduce el grado de contaminación de los explantes. En el caso de este trabajo las plantas madre estaban bajo

condiciones de campo abierto, lo que quizá tenga que ver con el alto grado de contaminación en los ensayos.

5.2.2 Efecto de los reguladores de crecimiento

En los ensayos para establecer el método de micropropagación en cultivo de tejidos, se probaron varios tratamientos. En la primera combinación (matriz 1) de cinetina y 6-BAP (0 a 6mgL^{-1}) no se observó un gran desarrollo de los explantes, de hecho, cada vez que se les hizo cambio de medio de cultivo, se hizo cada vez más pequeño, hasta llegar a un punto en que el explante muere debido a la oxidación y fenolización, que se observó tres semanas después del establecimiento del experimento y fue uno de los principales problemas que se tuvo a lo largo de todo este trabajo. Esto a pesar de usar ácido cítrico y carbón activado a dosis mencionadas por otros autores para combatir estos dos problemas (Peña *et al.*, 2012; Abobkar *et al.*, 2012).

Como resultado final se encontró que el 80 % de los explantes de la matriz 1 murieron debido a la fenolización después de tres meses de cultivo. Los explantes que sobrevivieron mostraron después de tres meses de cultivo una ligera elongación de los explantes, aunque después de este tiempo se observó necrosis en la base del explante que finalmente los llevó a la muerte después de 12 semanas de cultivo.

A pesar del difícil control de la fenolización, se observaron explantes que mostraban cierta respuesta a las diferentes combinaciones de reguladores, esas combinaciones fueron (A, B, C, D, E, G, H, I, K, N, R y T). Las características en común observadas fueron: elongación del explante inicial, seguido de una ligera hinchazón del explante. Otros autores (Choudhary, 2015; Murch *et al.*, 2007; Vijayan *et al.*, 2011) han logrado la micropropagación de varias especies de la familia moráceas, incluyendo la del ramón, usando cinetina, BA o AIA como reguladores, y

observando resultados después de tres y ocho semanas después de iniciar sus experimentos (Martínez *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en estos laboratorios sugieren que esta especie es difícil de micropropagar principalmente debido a 1) la contaminación, 2) la fenolización de los explantes.

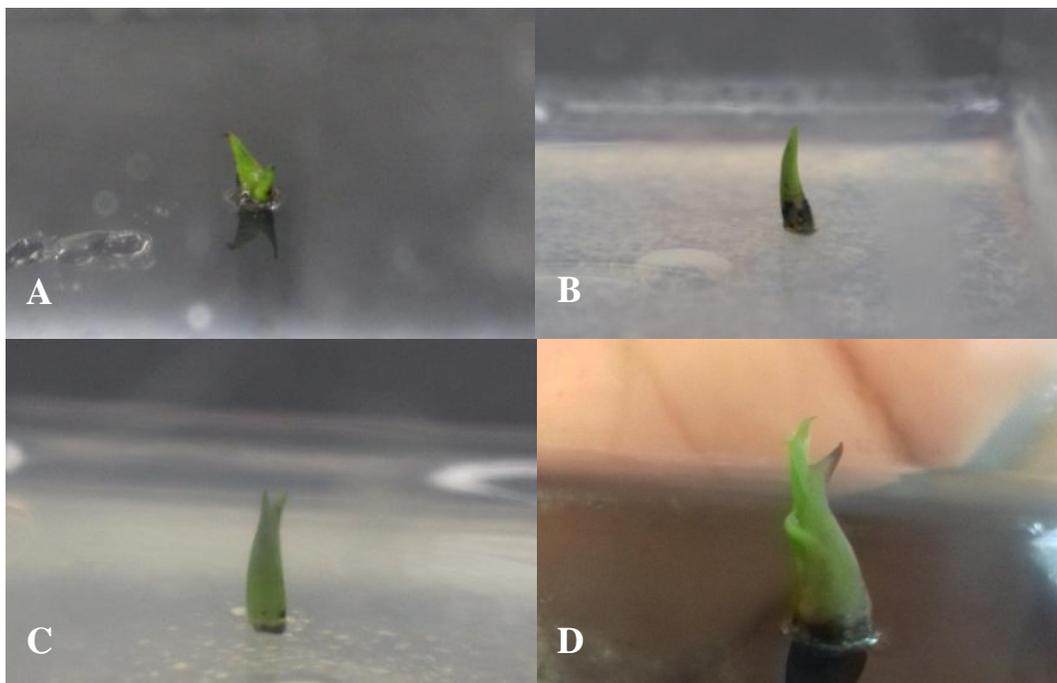


Figura 5 Explantes de *Brosimum alicastrum* después de tres meses de cultivo. A) Explante con una combinación de 6 mg L^{-1} de 6-BAP y 1 mg L^{-1} de cinetina. B) Explante con una combinación de 2 mg L^{-1} de cinetina. C) Explante con una combinación de 2 mg L^{-1} de 6 BAP y 1 mg L^{-1} de cinetina. D) explante con 5 mg L^{-1} de cinetina. Obsérvese fenolización en la base de los explantes.

5.3 Injerto

5.3.1 Prendimiento del injerto

Los resultados del presente estudio señalan que sí se puede injertar el ramón y los que prosperaron después de 8 meses han seguido creciendo y diferenciándose. Una segunda conclusión del presente estudio señala que no es fácil que los injertos prosperen ya que en nuestros ensayos el porcentaje de prendimiento fue muy bajo ($\leq 1.6\%$), lo que hace a esta especie difícil de injertar. Se logró tener dos injertos exitosos que cumplieron con las tres etapas que señala Hartman *et al.*, (2002) para que un injerto sea posible.

¿Por qué no prosperaron muchos de los injertos que se establecieron? es difícil de explicar en el presente trabajo. Se puede señalar que quizá se deba al abundante flujo de látex que presenta la planta y que se presume contiene compuestos secundarios, principalmente fenoles que, de acuerdo con Errea (1998), son los compuestos principales que afectan al sitio de unión del injerto, haciendo que sea prácticamente imposible la unión entre el patrón y la estaquilla.

Además de la incompatibilidad del injerto, se observó que muchos se contaminaron por hongos a lo largo de las estaquillas, en la zona de unión del injerto se hace visible después de tres semanas de haber hecho el injerto. El fungicida aplicado no mostró efectividad para el control de hongos, lo que indica una gran carga de contaminación endógena del material injertado.

Los resultados del presente trabajo no concuerdan con los reportados en especies de la misma familia por Maheswari y Nivetha (2015), que obtuvieron un éxito entre 48 % y 82 % en injerto de yema en yaca (*Artocarpus heterophyllus*), esto quizá se debió a que la especie es de

madera blanda, a diferencia del ramón, es un árbol más lignificado. Otros resultados indican que el método de injerto influye en el éxito del mismo, como afirma Harshavardhan *et al.*, (2014), quienes obtuvieron resultados en *Artocarpus heterophyllus*, haciendo injertos de tipo lateral (53 % de prendimiento) y con injerto de púa (32 % de prendimiento).

5.3.2 Desarrollo de los injertos exitosos

Al inicio de la observación, el injerto 1 tenía una altura inicial de 32.5 cm, 105 días después de injertar, al día 217 después de injertar tenía una altura de 37.7 cm . El injerto 2 tenía 24 cm de altura 56 días después de injertar y 140 días después de injertar tenía 25.1 cm de altura. Estas mediciones realizadas indican un crecimiento entre 0.2 cm a 1.3 cm al mes en el injerto, observándose los picos de máximo crecimiento, que coinciden con un aumento en el número de hojas, cada 2 meses, durante el tiempo de observación (Figura 6).

Además de lo anterior, se consideró útil comparar la tasa de crecimiento de estos injertos con el crecimiento de una planta sin injertar de aproximadamente la misma edad, y se pudo observar que este creció entre 1 cm y 4.1cm en el mismo período. Esto indica, como era de esperarse, un crecimiento más lento para el injerto comparado con la planta sin injertar.

Por otra parte es importante señalar que 228 días después de injertar, los injertos exitosos mostraron un crecimiento, señal de que en los centros de unión lograron fusionarse debidamente lo que permitió que continuara la diferenciación y desdiferenciación de los tejidos entre la yema y el patrón (Hartman *et al.*, 2012).

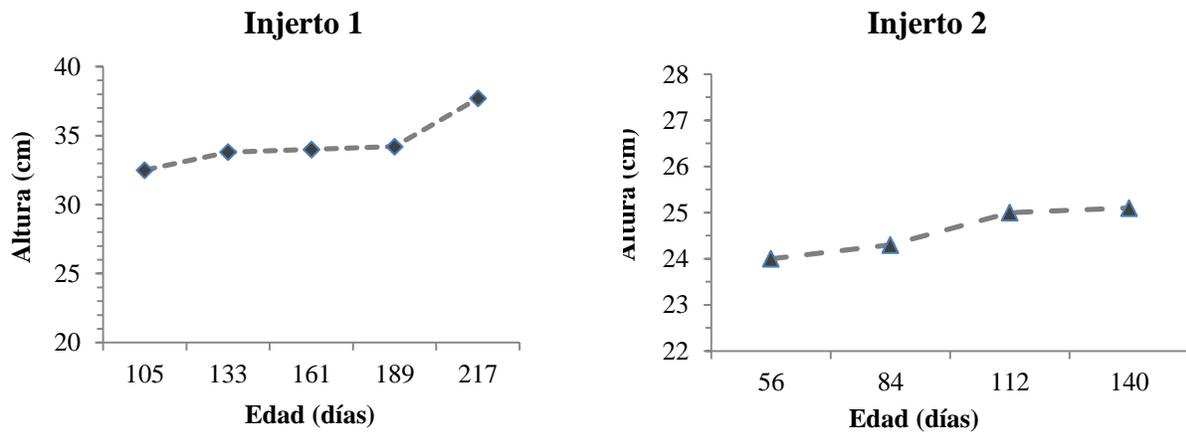


Figura 6. Altura de dos injertos de *Brosimum alicastrum*. Las medidas registran el crecimiento de los injertos 1 y 2 hasta el día 217 y 140 después de injertar, respectivamente.

5.3.3 Número de hojas

La aparición de hojas y crecimiento de las mismas aconteció entre los 25 y 45 días después de injertar. Después del primer mes, cuando las primeras hojas se han formado y desarrollado completamente, surgieron nuevas hojas en el transcurso de los 30 días posteriores, de manera que en los primeros 60 días después de hacer el injerto, el número de hojas prácticamente se duplicó. Después de dos meses, aparecieron en promedio tres hojas al mes y así se fue registrando durante los ocho meses posteriores en que los injertos estuvieron en observación.

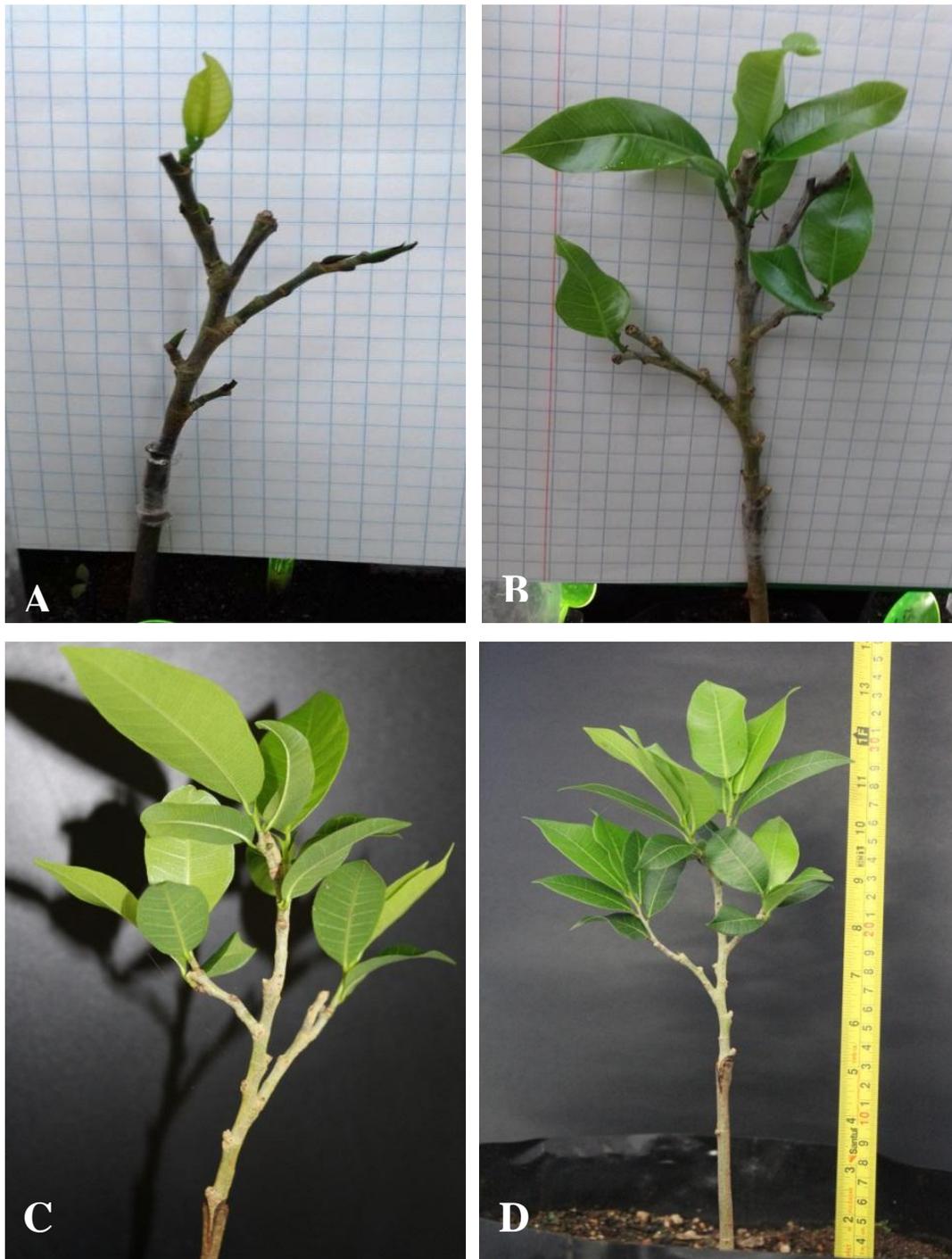


Figura 7. Desarrollo de un injerto de ramón de los 25 a los 155 días después de injertar. A) injerto de ramón 25 días después de injertar. B) injerto con 40 días de edad. C) injerto con 115 días de edad. D) injerto a los 155 días de edad.

Un hecho importante que se observó fue que en ambos injertos exitosos no se perdió la capacidad de floración de la planta; ya que a los cuatro meses después de injertar se observaron nuevos brotes florales, lo que confirma que la planta no perdió el mensaje de diferenciación floral, que en caso de estudio sigue siendo una hembra representativa de la planta madre (Figura 8).



Figura 8. Floración en injerto de ramón. A) injerto de ocho meses de edad. B) Acercamiento a la yema floral.

Literatura referente al número de hojas indica que la altura y grosor del patrón debido a su madurez fisiológica, juegan un papel importante, en la cual patrones más jóvenes contienen más carbohidratos y nutrientes que se traducen en un mayor número de hojas, tal como señala (Zimmerman, 1958). El crecimiento en el número de hojas en dos injertos de ramón se muestra en la figura 9.

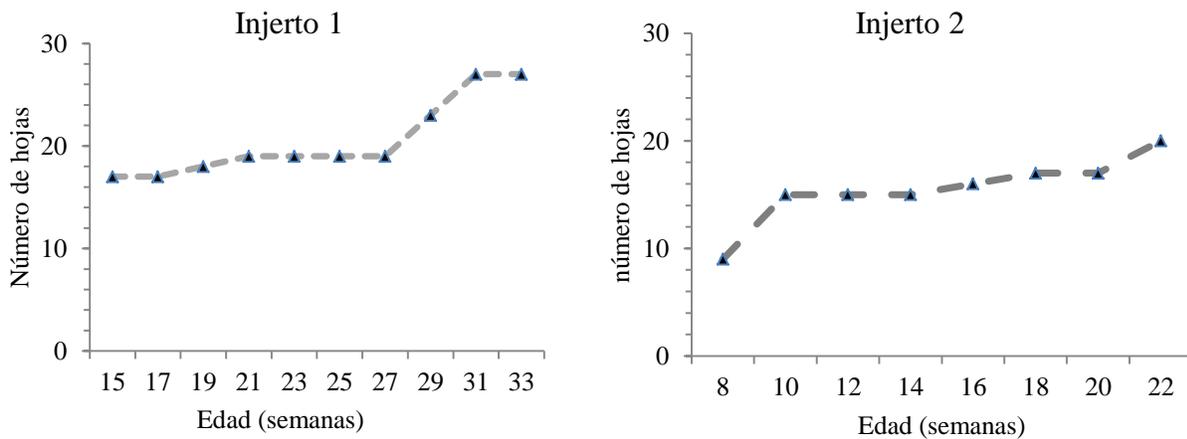


Figura 9 Número de hojas en dos injertos de *Brosimum alicastrum*. Los datos fueron tomados entre la semana ocho y 33 después de injertar.

5.3.4 Área foliar del injerto

El injerto uno después de cinco meses había desarrollado un área foliar de 239.98 cm²; al sexto mes registró un área de 384.87 cm²; mientras el séptimo mes registró un área foliar de 394.9 cm². El área foliar promedio del segundo injerto fue de 109.73cm² dos meses y medio después de practicarse y a los tres y medio meses ya tenía 129.5 cm²; a los cuatro meses y medio registró 235.25 cm². Las mismas mediciones, realizadas en una planta testigo sin injertar y de la misma edad, mostró un área foliar de 624.16 cm² para el quinto mes, 825.41 cm² y 1174.41 para el sexto y séptimo mes, respectivamente.

Los resultados para el injerto uno indican un crecimiento de 154.92 cm^2 entre el quinto y séptimo mes después de injertar. Por su parte el injerto dos mostró un crecimiento de 125.52 cm^2 entre los tres meses y medio y cuatro meses y medio después de injertar. Trabajo similar hecho con injertos cuyo patrón fue *Artocarpus heterophyllus*, expusieron un área foliar entre 65 y 68 cm^2 , respectivamente al término del experimento (Maheswari y Nivetha, 2015).

Estos datos sugieren que los injertos forman un menor área foliar comparado con una planta sin injertar, posiblemente debido, primero, al gran estrés al que la planta es sometida al injertarse, y la segunda es el lento proceso de recuperación que muestra la planta, al menos en los primeros cinco meses después de injertar; así como también intervienen factores como la edad del patrón, uso de fitohormonas y la fertilización (Harshavardhan y Rajasekhar, 2012; Karimi y Norozy, 2017; Zenginbal y Eşitken, 2016).

5.3.5 Sobrevivencia del patrón

A pesar de que la mayoría de los injertos no prosperaron, esto no implicó la muerte del patrón utilizado; de hecho, se llegaron a hacer hasta tres ensayos sobre el mismo patrón sin que este sufriera daños que los lleve a la muerte. El porcentaje de sobrevivencia del patrón fue de 96%. Estos resultados son similares con los presentados por Maheswari y Nivetha (2015), quienes obtuvieron un porcentaje de sobrevivencia de 95 a 93% en injerto de *Artocarpus heterophyllus*, especie de familia Morácea, la misma del ramón.

6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se comprobó que es posible propagar vegetativamente el ramón a través de la técnica de injerto, aunque el porcentaje de prendimiento es muy bajo, lo cual no es recomendable en caso de establecer plantaciones comerciales a través de injertos. En las estacas no se pudo favorecer el enraizado utilizando fitohormonas en el presente estudio

La micropropagación del ramón utilizando el cultivo de tejidos después de 8 meses no mostró avances significativos. Sólo se logró establecer la primera etapa en el cultivo *in vitro* de explantes a partir de yemas apicales y laterales de *Brosimum alicastrum*.

Se señala que es relevante mantener asepsia en el material vegetal para cualquier método de propagación clonal en esta especie, debido a que la contaminación fue el principal problema observado durante todo el trabajo, lo cual sugiere que se deben encaminar esfuerzos para estudiar más este problema.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abobkar, M.S., Ahmed M.E. (2012). Plant Tissue Culture Media. En A. Leva (ed.) *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. InTech, pp. 29-38
- Aloni, R. (2004). The induction of vascular tissues by auxin. En Davies, P.J. (ed.). *Plant hormone*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp. 471-492
- Altman, A., Goren, R. (1974). Growth and dormancy cycles in *Citrus* bud cultures and their hormonal control. *Physiol. Plant.* 30, 240-245.
- Altman, A., Levin, N. (1993). Interactions of polyamides and nitrogen nutrition in plants. *Physiol. Plant.* 89, 653-658.
- Aralikatti, G. (2005). *Sotwood grafting and in vitro propagation studies in jackfruit (Artocarpus heterophyllus Lam.)*. (Tesis de maestría). Universidad de Ciencias Agrícolas. Dharward, Karnataka, India.
- Attia, A.O., Sdessokey, E., El-Hallous, E.I., Shaaban, H.F. (2014). Micropropagation of mulberry (*Morus alba* L.) cv. Al-Taify. *International Journal of Bio-Technology and Research*, 4(2). 15-22.
- Banco Mundial. (06 de octubre del 2017). Población, total [Banco de datos]. Recuperado de: <http://datos.bancomundial.org/indicador/SP.POP.TOTL?view=chart>
- Barquera, B. Z. (2013). *Obtención de bioetanol a partir de semillas de ramón (Brosimum alicastrum Sw)*. (Tesis de maestría). Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Mérida, México. P. 85

- Berg, C. C. (1972). *Brosimum alicastrum*. Flora neotrópica. 7, 170-171
- Bettinger, P., Clutter, M., Siry, J., Kane, M., Pait, J. (2009). Broad implications of southern United States pine clonal forestry on planning and management of forests. *International Forestry Review*, 11(3), 331-345.
- Bhojwani, S. S., Dantu, P. K. (2013). *Plant tissue culture: an introductory text*. Springer, India, p. 245.
- Burdon, R. D., Carson, M. J., Shelbourne, C. J. (2008). Achievements in forest tree genetic improvement in Australia and New Zealand 10: *Pinus radiata* in New Zealand, *Australian Forestry*, 71(4), 263-279.
- Burns, R. M., Mosquera, M. S., Whitmore, J. L. (1998). Useful trees of the tropical regions of north america. Washington, D.C. U.S.A. North America Forestry commission p. 447.
- Chavelas, P. J., Dewall, M. S. (1988). Árboles útiles de la parte tropical de América del Norte. *Grupo de estudio de silvicultura. Comisión Forestal de América de Norte*. No. 3. Washington, EE.UU.
- Choudhary, R., Chaudhury, R., Malik, S.K. (2015). Development of an efficient regeneration and rapid clonal multiplication protocol for three different *Morus* species using dormant buds as explants. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 90(3), 245-253.
- Consejo Nacional de Población. (2012). Proyecciones de la población de México 2010-2050. Subdirección de desarrollo editorial. México. P. 84-91.

- Delgado, D.C., La, O., Santos, Y. (2002). Determinación del valor nutritivo del follaje de dos árboles forrajeros tropicales: *Brosimum alicastrum* y *Bauhinia galpinii*. *Revista cubana de ciencias agrícolas* 36(4) 391-395.
- Durán, R.C., Trejo, G., y Simá, J.C. (2000). *Listado florístico de la península de Yucatán* (No. CY/581.097265 L57). Mérida, México.
- Enjalric, F., Carron, M. P., y Lardet, L. (1988). Contamination of primary cultures in tropical areas: the case of *Hevea brasiliensis*. *Acta Horti* 225: 57-65.
- Errea, P. (1998). Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species, *Scientia Horticulturae*, 74(3), 195-205.
- Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. (2016). Panorama agroalimentario: Maíz. México. Pp. 41.
- Flora Digital: Península de Yucatán, herbario CICY, Unidad de Recursos Naturales. 06 de octubre del 2017. Flora de la península de Yucatán [sitio web] recuperado de http://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=1835
- George, E.F., et al (eds). (2008). *Plant propagation by tissue culture*. Tercera edición. Springer. P. 1-28.
- Gillespie, A.R., Bocanegra, F.D., Jiménez O.J. (2004). The propagation of ramón (*Brosimum alicastrum* Sw. Moraceae) in mayan home gardens of the Yucatan peninsula of México. *New forests*, 27, 25-38.

- Gomes, G. A., Paiva, R., de Oliveira P. P., de Santiago, E. J. (2003). Plant regeneration from callus cultures of *Maclura tinctoria*, an endangered woody species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39(3), 293-295.
- Harshavardhan, A., Rajasekhar, M., Reddy, P. S., Krishna, K. U. (2012). Effect of environmental condition, method and time of grafting on graft success in two varieties of jackfruit, In *Proceedings of the International Symposium on Minor Fruits and Medicinal Plants for Health and Ecological Security (ISMF & MP)*, West Bengal, India, 19-22 December, 2011, pp. 140-144.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., Geneve, R. L., (2002). *Plant Propagation: Principles and Practices*, seventh ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, ISBN 0-13-6792359, pp. 849.
- Hernández, G. O., Vergara, Y. S., Larqué, S. A. (2015). Studies on the productivity of *Brosimum alicastrum* a tropical tree used for animal feed in the Yucatan Peninsula. En *Wulfenia journal*, 22(7) 206-207.
- Huchin, P. E. (2015). Aislamiento de la microbiota del fruto de *Brosimum alicastrum* Sw. para su uso en la producción de bioetanol. (Tesis de maestría). Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, México.
- Hussain, A., Quarshi, I. A., Nazir, H., Hullah, I. (2012). Plant tissue culture: current status and opportunities. En A. Leva y L.M. Rinaldi (ed.), *Recent advances in plant in vitro culture*. Intech. P 1-21

Instituto Nacional de Biodiversidad. (03 de Octubre de 2017). Información sobre especies [sitio web] recuperado de: <http://atta.inbio.ac.cr/>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (06 de octubre de 2017). México en cifras [sitio de consulta] Recuperado de: <http://www.beta.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/>

Isikawa, H. (1974). In vitro formation of adventitious buds and roots on the hypocotyls of *Cryptomeria japonica*, Bot. Mag. 87, 73-77.

Jain, S. M., Häggman, H. (Eds.). (2007). Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Springer Science Business Media.

Karimi, H. R., Nowrozy, M. (2017). Effects of rootstock and scion on graft success and vegetative parameters of pomegranate. En *Scientia Horticulturae*, 214, pp. 80-287. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.047>.

Larqué-Saavedra, F. A. (06 de abril del 2011). Propuesta de un sistema productor de semillas para reducir la importación de granos. *La crónica de hoy*. Recuperado de: <http://www.cronica.com.mx/notas/2011/571026.html>

Larqué-Saavedra, F. A. (06 de junio de 2012). Todos contra el hambre. *La crónica de hoy*. Recuperado de: <http://www.cronica.com.mx/notas/2012/666847.html>

Larqué-Saavedra, F. A. (17 de mayo de 2017). El árbol de ramón por su alta productividad clave para la nueva revolución verde. *La crónica de hoy*. Recuperado de: <http://www.cronica.com.mx/notas/2017/1024029.html>

- Loyola, V. V., Ochoa, A. N. (2012). *Plant cell culture protocols: methods in molecular biology*. Tercera edición. Springer Science.
- Maheswari, U. T., Nivetha, K. (2015). Effect of age of the rootstock on the success of softwood grafting in jack (*Artocarpus heterophyllus* LAM). *Plant archives* 15(2) 823-825.
- Majada, J., Martínez, A. C., Feito, I., Kidelman, A., Aranda, I., Alía, R. (2011). Mini-cuttings: an effective technique for the propagation of *Pinus pinaster* Ait. *New Forests*, 41(3), 399-412.
- Martínez, C. R., Gutiérrez, E. J., Arrazate, C. H. (2013). Protocolo de multiplicación y conservación *in vitro* de cuatro especies forestales tropicales de semillas recalcitrantes caso: Ramón (*Brosimum alicastrum*). INIFAP-SEMARNAT-CONAFOR, pp. 2-18.
- Montañez, E. P., García, B. L., Jiménez, O. J., Nahed, T. J. (2009). Establecimiento de asociaciones arbóreas con caoba y ramón en una cantera abandonada en Yucatán, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(2), 177-183.
- Morales, E., Herrera, L. (2009). Ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz). Protocolo para su colecta, beneficio y almacenaje. CONAFOR, México. Pp.17
- Mudge, K., Janick, J., Scofield, S., Goldschmidt, E. (2009). A history of grafting. *Horticultural reviews*, 35, 437
- Muñoz, G. L., Vargas H. J., López-U. J., Soto H. M. (2009). Effect of cutting, age and substrate temperature on rooting of *Taxus globosa*, *New forests*, 38(2), 187-196.

- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murch, S. J., Ragone, D., Shi, W. L., Alan, A. R., Saxena, P. K. (2007). *In vitro* conservation and micropropagation of breadfruit (*Artocarpus altilis*, Moracea). In: *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, Springer, Dordrecht, pp. 279-288.
- National Academy of Science. (1975). Underexploited tropical plants with promising economy value. National Research council, Was. D.C. EE.UU, pp. 114 188.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2017). Alimentación y agricultura sostenibles [sitio de consulta] Recuperado de: <http://www.fao.org/sustainability/background/es/>
- Overgaard, I. (1992). *The establishment of a tree nursery in Yucatan, México. The promotion of an age old Mayan subsistence tree.* (Thesis Master of Science), Institute of Forestry Agricultural, University of Norway, Norway, Pp.109
- Pardo, T. E., Sánchez, M. (1980). Ramón, capomo, ojite, ojoche, *Brosimum alicastrum*: Recurso silvestre tropical desaprovechado. *Instituto Nacional de Recursos Bióticos* 3, 5-27.
- Pennington, T. D., Sarukhán, J. (2005). *Árboles tropicales de México: manual para la identificación de las principales especies.* UNAM. México.
- Peña, Y., Juárez, J., González, J. A., Robert, M. L. (2012). Tissue culture methods for the clonal propagation and genetic improvement of Spanish red cedar (*Cedrela odorata*). In: *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ. p. 129-141

- Peters, C. M., Pardo, T. E. (1982). *Brosimum alicastrum* (Moraceae): uses and potential in Mexico. *Economic Botany*, 36(2), 166-175.
- Pio, R., Ohlan, T., Chagas, E.A., Campagnolo, M. A., Dalastra, I.D. (2008). Enraizamiento de estacas de raíz de Figo 'roxo de valinho' tratadas con AIB y dos métodos de inmersión. *Scientia agraria*, 9, 111-115.
- Prad, J. Y., Retournard, D. (2003). Injerto de todos los árboles y arbustos. Segunda edición. Editorial Omega. España. P. 304.
- Pradhan, A. N., Vishwanathan, A. S., Basavaraja, R. (2010). Effect of nutrients on *in vitro* culture of *Morus alba* L. (White mulberry). *Bioresearch Bulletin*, 19-23.
- Puente, P.C. (1995). Almacenamiento de semillas de ramón (*Brosimum alicastrum*). En: Avances en la producción de semillas forestales en América Latina. Memorias del simposio. Managua, Nicaragua.
- Rico, G. V., Gomez, P. A., Chan, C. (1985). Las selvas manejadas por los mayas de Yohaltún, Campeche, México. *Biotica* 10(4), 321-327.
- Rivera, R. M., Vargas, H. J., López, U. J., Villegas, M. A., Jiménez, C.M. (2016). Enraizamiento de estacas de *Pinus patula*. *Revista fitotecnia mexicana*, 39(4), 385-392.
- Rodríguez, V. J., Sinaca, C. P., Jamangapé, G. G. (2009). Frutos y semillas de árboles tropicales de México. INE-SEMARNAT. México, D.F.

- Ruiz, G. R., Vargas, H. J., Cetina, A. V., Villegas, M. A. (2005). Efecto del ácido indolbutírico (AIB) y tipo de estaca en el enraizado de *Gmelina arborea* Roxb. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28(4) 319-326.
- Saad, A. I., Elshahed, A. M. (2012). Plant tissue culture media. En A. Leva y L.M Rinaldi (ed), *Recent advances in plant in vitro culture* (Pp. 30-40). Intech. DOI: 10.5772/50569
- Salazar, R., Soihet, C., Méndez, J. M. (2000). Manejo de semillas de 100 especies forestales de América Latina. *Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE)*, Turrialba, Costa Rica.
- Silva, D. B., Vieira, R. F., Cordeiro, M. C., Pereira, E. B., Pereira, A. V. (2011). Propagación vegetativa de *Brosimum gaudauchaudii* por estaca de raíces. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 13(2), 151-156.
- Vega, A., Valdez, J. I., Cetina, V. M. (2003). Zonas ecológicas de *Brosimum alicastrum* en las costa del Pacífico mexicano. *Madera y bosque* 9, 27-53.
- Vergara, Y. S., Briceño, S. C., Pérez, B. J., Hernández, G. O., Rosado. L. L. Larqué, S. A. (2014). Publicaciones de *Brosimum alicastrum*. Mérida, Mexico. Pp. 101.
- Vijayan, K., Tikader, A., da Silva, J. A. (2011). Application of tissue culture techniques for propagation and crop improvement in mulberry (*Morus* spp.). *Tree Forest Sci. Biotech*, 5, 1-13.
- Warschefsky, J. E., Klein, L. L., Frank, H. M., Chitwood, H. D., Londo, P. J., von, J. E., Allison, W.J. (2016). Rootstocks: Diversity, domestication, and impacts on shoot phenotypes.

En: *Trends in Plant Science*, 21, 418-437. Doi:
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.11.008>

Yáñez, R. M., Ricalde, R. S., Aviles, L. R., Franco, L. S. (2010). Utilización de Ramón (*Brosimum alicastrum* Sw.) y Cayena (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) en la alimentación de conejos. *Zootecnia Tropical*, 28(2), 153-162.

Yoganandha, B. D. (1989). *Studies on propagation of cashew (Anacardium occidentale L.) by In situ softwood grafting*. (Tesis de doctorado). Universidad Agrícola de Bangaluru, India.

Zaki, M., Kaloo, Z., Sofi, M. (2011). Micropropagation of *Morus nigra* L. from nodal segments with axillary buds. *World Journal of Agriculture Sciences*, 7, 496–503.

Zenginbal, H., Eşitken, A. (2016). Effect of the application of various substances and grafting methods on the grafting success and growth of black mulberry (*Morus nigra* L). *Acta Sci. Pol. Hortorum cultus*, 15(4), 99-109.

Zimmerman, M. M. (1958). Translocation of organic substances in the phloem of trees. *The Physiology of forest trees*. New York Ronald press.

8 ANEXOS

Anexo 1. Papel del ácido salicílico en el control del desarrollo, productividad y crecimiento general de plantas.

Role of Salicylic Acid in the Control of General Plant Growth, Development, and Productivity

1

Cesar J. Tucuch-Haas, Jesica V. Pérez-Balam, Karen B. Díaz-Magaña, José Manuel Castillo-Chuc, María G. Dzib-Ek, Gabriel Alcántar-González, Silvia Vergara-Yoisura, and Alfonso Larqué-Saavedra

Abstract

Applications of low concentrations of salicylic acid (SA) to the shoots of seedlings of horticultural plants such as habanero pepper (*Capsicum chinense*) or to perennial trees such as the Ramon (*Brosimum alicastrum*) significantly increase their growth, development and productivity.

In chili pepper it was found that the positive effect of SA on root growth is correlated with an increased uptake of macro nutrients and micronutrients which are allocated in the plant tissues. Data have shown that plant tissues treated with SA had significantly higher levels of macronutrients. Accumulation of nitrogen, phosphorus and potassium was higher in fruits (116%, 110% and 97%), leaves (45.5%, 39.4% and 29.1%), roots (52.6%, 17% and 29.4%), and stems (5.0%, 39.4% and 28.3%) with respect to the control plants. The levels of other nutrients, such as copper, zinc, manganese, boron, calcium, magnesium and iron, were also higher.

The application of 1 μ M SA to shoots of trees, affected the root length. The control plants had 42 cm, and those of the treated plants 65.5 cm, equivalent to an increase of 55.7%. Fresh weight of the root was 158.3% higher in the treated plants and the dry weight increased by 160.7%. Increases were also observed in stem length (46%), stem diameter (25.9%), fresh weight (78.3%), and dry weight (89%), in comparison with the control. The number of leaves presented in treated plants averaged 12.6, whereas the control plants showed an average of 9 leaves with a lower leaf area.

Keywords

Salicylic acid • Root • Growth regulation

C.J. Tucuch-Haas • G. Alcántar-González

Edafología, Colegio de Postgraduados, Carretera Federal México–Texcoco km 36.5 Montecillo, Texcoco, Estado de México C.P. 56230, Mexico

e-mail: tucuch.cesar@colpos.mx; alcantar@colpos.mx

J.V. Pérez-Balam • K.B. Díaz-Magaña • J.M. Castillo-Chuc • M.G. Dzib-Ek

S. Vergara-Yoisura • A. Larqué-Saavedra (✉)

Recursos Naturales, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, por 32 y 34, Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán C.P. 97205, Mexico

e-mail: jesica_pp@hotmail.com; karen.diaz@cicy.mx; jose.castillo@cicy.mx; gabriela_capuleto@hotmail.com; silvana@cicy.mx; larque@cicy.mx

© Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2017

R. Nazar et al. (eds.), *Salicylic Acid: A Multifaceted Hormone*, https://doi.org/10.1007/978-981-10-6068-7_1