

# MICORRIZACIÓN Y PODA AÉREA EN LA CALIDAD DE PLANTA DE PINO PIÑONERO EN INVERNADERO

L. Mohedano-Caballero<sup>1</sup>; V. M. Cetina-Alcalá<sup>2</sup>; G. Vera-Castillo<sup>3</sup>; R. Ferrera-Cerrato<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Ingeniero Forestal. Estudiante de maestría en Ciencias. Especialidad Forestal. Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Edo. de México.

<sup>2</sup>Doctor en Ciencias. Profesor investigador. Especialidad Forestal, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Edo. de México.

<sup>3</sup>Doctor en Ciencias. Investigador del Programa de Viveros y Plantaciones Forestales. CEVAMEX, CIRCE. INIFAP. Km. Carr. México-Veracruz, via Texcoco, Texcoco Edo. de México.

<sup>4</sup>Doctor en Ciencias. Profesor investigador. Especialidad Microbiología, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Edo. de México.

## RESUMEN

La finalidad del trabajo fue evaluar prácticas culturales que incrementen la calidad en la producción de plantas de *Pinus cembroides* Zucc., en invernadero en Montecillo, México, y su afinidad con un consorcio micorrízico de hongos (suelo rizosférico) colectado de un bosque natural de pino piñonero. Se establecieron seis tratamientos como resultado de la interacción de las variables fundamentales, micorrización (con y sin micorriza) y poda aérea (0, 25 y 50%), con plantas en envase de plástico (156 cm<sup>3</sup>) en invernadero. La inoculación se realizó a los cuatro meses de edad en forma de mezcla de sustrato de crecimiento con suelo rizosférico. Además, al momento del trasplante se agregó suelo rizosférico en contacto con la raíz de cada planta. Se realizaron cinco muestreos para evaluar variables morfológicas y fisiológicas. Con los datos de algunas variables se obtuvieron índices de comparación de calidad, como el de Dickson y de Eficiencia de transpiración. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza ( $P \leq 0.0001$ ) y una prueba de medias. Se concluye que las plántulas de *Pinus cembroides* Zucc., inoculadas con hongos micorrízicos y podadas al 25% del follaje, produjeron plantas de mejor calidad, expresada en términos morfológicos y fisiológicos. Se identificaron además tres géneros de hongos micorrízicos en el sitio de colecta del inóculo, *Clitocybe*, *Inocybe* y *Leucopaxillus*.

**PALABRAS CLAVE:** Calidad de planta, *Clitocybe*, *Inocybe*, invernadero, *Leucopaxillus*, micorriza, *Pinus cembroides*, poda aérea.

## MYCORRHIZA AND AERIAL PRUNING IN THE QUALITY OF PINION IN GREENHOUSE

### SUMMARY

This study was done to assess cultural practices done to increase seedling quality of *Pinus cembroides* Zucc. grown in a greenhouse at Montecillo, Mexico, and this species' affinity with a group of mycorrhizal fungi (rhizospheric soil), collected from a natural forest of pinion. Six treatments were applied as a result of the interaction between two essential variables: mycorrhiza (inoculated and non-inoculated seedlings) and aerial pruning (0, 25 and 50%), in greenhouse-grown seedlings in containers (156 cm<sup>3</sup>). Inoculation was carried out four months after germination with a mixture composed of substrate and rhizospheric soil. During transplanting, dry rhizospheric soil was placed in contact with the root system. Five samplings were done, one per month, to evaluate morphological and physiological variables. In addition, variables such as quality index and transpiration efficiency were obtained. Data were analyzed with ANOVA ( $P \leq 0.0001$ ) and a test of means. The results of the six different treatments obtained from the mycorrhiza-pruning interaction showed that inoculated, 25% pruned seedlings of *Pinus cembroides* Zucc. produced plants with higher quality in terms of morphology and physiology. Three species of mycorrhizal fungi were obtained from the inoculum collection site: *Clitocybe*, *Inocybe* and *Leucopaxillus*.

**KEY WORDS:** aerial pruning, *Clitocybe*, greenhouse, *Inocybe*, *Leucopaxillus*, Mycorrhizae, *Pinus cembroides*, seedling quality.

## INTRODUCCIÓN

Los desbalances naturales, como la extrema sequía e inundaciones, traen consigo problemas asociados de mayor impacto en los suelos forestales y de vocación forestal, originando incendios devastadores y aludes que igualmente provocan la pérdida de la riqueza asociada a la vegetación forestal. El empobrecimiento de los suelos tiene diversos orígenes de tipo natural e inducido. Ante los primeros, no se puede más que prever en la medida de lo posible y actuar rápidamente una vez que se presentan. Ante los segundos, es necesario asumir actitudes frontales a favor del recurso, sin más interés que la recuperación de la riqueza ecológica, que ha caracterizado a México. El daño que han sufrido las superficies forestales en nuestro país en el pasado, como consecuencia del mal uso, insuficientes e inadecuados planes de conservación y fomento, aunado al desequilibrio social y económico de los pobladores del bosque, provocan cambios de uso del suelo, modificando la vocación de terrenos forestales hacia una agricultura de bajo rendimiento, a la vez que incrementa la siniestralidad y la erosión. Lo anterior desemboca irremediablemente en desequilibrios ecológicos y la pérdida del potencial productivo a corto plazo.

Debido a su ubicación geográfica, la diversidad climática, orográfica y edáfica, así como otras condiciones ecológicas, México se caracteriza por tener una de las floras más ricas del mundo, en particular de la Familia Pinaceae y de manera específica, el grupo de los pinos piñoneros, los cuales son un grupo taxonómico supraespecífico del género *Pinus*, formado por 11 a 13 especies, de entre las cuales *Pinus cembroides* Zucc., es la principal proveedora de semilla de piñón en México. Tiene un alto potencial adaptativo y resistencia a condiciones climáticas difíciles, por lo que es una especie útil para fines de repoblación en áreas forestales, especialmente en zonas secas y erosionadas del país (Zavala *et al.*, 1987). Por lo anterior, los objetivos de la presente investigación son: 1) evaluar el crecimiento de las plantas de *Pinus cembroides* Zucc., producidas en invernadero como respuesta a la inoculación micorrízica y a la poda aérea, 2) identificar un consorcio micorrízico natural, capaz de establecer la asociación simbiótica con la especie de pino en estudio y, 3) determinar un porcentaje de poda aérea recomendable para el adecuado desarrollo de plantas de calidad, de pino piñonero, todo con la posibilidad de utilizar la especie en programas de plantación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en un invernadero del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, México. El material vegetal se obtuvo de la siembra de almácigos de *Pinus cembroides* Zucc., en charolas de plástico desinfectadas. La semilla se obtuvo por donación del Instituto de Zonas Áridas de la Universidad Autónoma de San Luís Potosí, de un rodal natural ubicado en el paraje La Amapola, S.L.P. Las semi-

llas se desinfectaron en una solución de cloro comercial y agua a fines de enero de 1998. El sustrato del almácigo fue una mezcla de peat moss y agrolita en una proporción 3:1, en condiciones de esterilidad comercial. Las plántulas germinadas permanecieron en las charolas cuatro meses, hasta fines del mes de mayo, cuando se trasplantaron a tubetes de plástico (156 cm<sup>3</sup>). El sustrato de crecimiento de las plántulas fue una mezcla de arena de río, peat moss y agrolita en una proporción 50:38:12%, esterilizado con bromuro de metilo en presentación comercial. Adicionalmente al sustrato se agregaron 18 gr del suelo rizosférico colectado en campo; de estos, el equivalente a 10 gr por contenedor se incorporó a la mezcla. Los restantes 8 gr por contenedor, se aplicaron directamente en cada envase, a manera de inoculación micorrízica propiamente. Al control también se le aplicó el mismo tratamiento (el suelo rizosférico adicionado fue esterilizado), a fin de obtener igual composición en ambos casos. La fuente de inóculo para la micorrización fue suelo rizosférico natural; la colecta de éste se llevó a cabo en un bosque natural de *Pinus cembroides* var. *orizabensis*, en el estado de Puebla.

Un mes después del trasplante se aplicaron los tratamientos de poda aérea en dos diferentes intensidades, 25 y 50% de la porción terminal del tallo, además del testigo sin poda. La finalidad de podar plantas tan pequeñas en tamaño edad es la de inducir mayor crecimiento de la porción radical, ya que la eliminación de tejido aéreo ha probado favorecer fisiológicamente algunas especies arbóreas, como se muestra en el apartado de resultados y discusión.

El diseño del experimento fue completamente al azar con 10 repeticiones. La unidad experimental contuvo seis individuos, con un total de 60 plantas por tratamiento micorrízico e intensidad de poda, y un total de 360 plantas.

- |  |        |
|--|--------|
| 1.- Sin poda y sin micorrización                               | (tp0)  |
| 2.- Poda aérea al 25% del follaje existente, sin micorrización | (tp25) |
| 3.- Poda aérea al 50% del follaje existente, sin micorrización | (tp50) |
| 4.- Sin poda y con micorrización                               | (mp0)  |
| 5.- Poda aérea al 25% del follaje existente, con micorrización | (mp25) |
| 6.- Poda aérea al 50% del follaje existente, con micorrización | (mp50) |

Las variables de respuesta consideradas en el experimento fueron medidas cada mes, de los 5 a 9 meses de edad de las plantas. El número de plantas utilizadas para la medición de las variables fue de tres individuos por cada tratamiento. Las variables a evaluar y su forma de medición fueron:

**Altura (cm).** Se obtuvo por medición directa desde la base del tallo a la yema apical, utilizando regla graduada a la precisión de 1 mm.

**Diámetro (mm).** Su medición se realizó con un vernier digital, en la base del tallo. La precisión alcanzada en la variable fue hasta centésimo de milímetro.

**Área foliar (cm<sup>2</sup>).** Ésta se obtuvo a través de la proyección de las acículas de las plantas en un integrador de área. Con esta metodología el valor del área foliar se está subestimando al considerar sólo una cara de la acícula ya que la sección transversal de ésta presenta formas irregulares; sin embargo, la facilidad de manejo y el objetivo de comparación entre tratamientos, hace recomendable el método con las debidas reservas (Cetina, 1998).

**Peso seco radical y aéreo (g).** Las variables de peso se obtuvieron de plantas deshidratadas en estufa a una temperatura de 70°C, durante 72 hs. La planta se seccionó a la altura del cuello de la raíz a fin de obtener valores separados de la porción aérea y radical, que se pesaron en una balanza electrónica, con una precisión de centésimas de gramo.

**Longitud de la raíz (cm).** Adicionalmente se midió esta variable a través del método de cuantificación completa, sugerido por Ferrera-Cerrato (Comunicación personal, 1998), que consistió en la fragmentación del sistema radical de la planta en segmentos fáciles de medir directamente bajo la lente de un estereoscopio. La longitud total del sistema fue la suma de estos segmentos unitarios, para lo cual se utilizó, además del estereoscopio, una escala graduada con aproximación al milímetro. La utilidad de esta variable se manifiesta en la determinación de la densidad micorrízica.

**Número de micorrizas.** Este se realizó identificando y contabilizando dichas estructuras a lo largo de la raíz. La identificación se basó en la forma de crecimiento característicamente dicotómica para el género *Pinus*, se obtuvo por conteo directo bajo lente de aumento.

**Densidad micorrízica. (número de micorrizas/ longitud de la raíz en cm).** Se obtuvo dividiendo el número de unidades micorrízicas en la raíz de la planta entre la longitud de su raíz. Para la presente investigación se propuso como unidad básica de longitud 10 cm.

**Pérdida de agua. (g agua evaporada/24 h).** La pérdida de agua de las plantas se cuantificó indirectamente a través del método gravimétrico, en un lapso de 24 hs, a una precisión de centésimo de gramo, utilizando para ello una balanza. El uso de este método se debió a la dificultad que ofrecen las acículas del pino para obtener la medición directa y puntual de la variable a través de aparatos.

**Cantidad de azúcares totales (mg/g materia seca).** Esta variable se obtuvo a través del método de laboratorio de Whitham *et al.*, (1971) generado para tal fin. Se utilizó tejido vegetal de la planta completa a fin de evaluar la concentración de azúcares totales. El análisis se hizo con la colaboración del laboratorio de Fisiología de Postcosecha de la especialidad de Fruticultura de la Institución.

**Índice de eficiencia de transpiración. (gramos de biomasa / gramos de agua transpirada).** Éste se define como una relación entre la producción de materia seca y la transpiración, para indicar el rendimiento económico de un cultivo en términos de uso de agua. O bien, la cantidad de biomasa producida por volumen de agua consumido. A medida que el valor del índice se aproxima a la unidad incrementa la eficiencia de las plantas (Rodríguez, 1986).

**Índice de calidad de planta de Dickson.** Es la combinación entre la Relación parte aérea-raíz (expresada en peso seco) y el Índice de Robustez que relaciona la altura (en cm) y el diámetro (en mm) de las plantas; de modo que el Índice de Dickson se expresa como (Cuevas, 1985):

$$\text{INDICE DE DICKSON} = \frac{\text{PST}}{\frac{\text{A}}{\text{D}} + \frac{\text{PSA}}{\text{PSR}}}$$

Donde:

PST: peso seco total de la planta (g)

PSA: peso seco de la porción aérea de la planta (g)

PSR: peso seco de la porción radical de la planta (g)

A: altura de la planta (cm)

D: diámetro de la planta (mm)

Se escogió este índice por su facilidad de cálculo y la frecuencia de uso en el medio de los productores de planta. Es importante señalar que mientras más cercano sea valor a la unidad, mayor es la calidad de la plántula que expresa.

La colecta de esporóforos. Durante el mes de agosto de 1998 se hicieron dos recorridos al sitio de colecta del inóculo para coleccionar cuerpos fructíferos de las especies de hongos que formaron parte del consorcio micorrízico utilizado; la identificación de éstos puede sentar las bases para conocer el consorcio micorrízico de interés, que podría estar interactuando con los fitobiontes en el bosque. La colecta se llevó a cabo durante el periodo de lluvias en la región, dirigiéndose fundamentalmente a los sitios donde había sido colectado el suelo rizosférico. El periodo de precipitación en la región es de sólo tres me-

ses, siendo agosto el más abundante en lluvia y hongos. Los basidiocarpos se fotografiaron y describieron, así como el sitio, se colectaron y conservaron. En el laboratorio se secaron con luz infrarroja para facilitar su conservación y posterior identificación macroscópica, la cual se solicitó al Dr. Gastón Guzmán, a través del Instituto de Ecología A. C., con sede en Xalapa, Veracruz.

Los resultados se analizaron para cada variable de respuesta en forma individual, relacionando la interacción de ambos factores, micorrización y poda, durante los cinco meses de crecimiento que duró el experimento, aunque poniendo énfasis en la comparación entre tratamientos al final del tiempo del experimento, esto es, los valores del quinto muestreo, a la edad de nueve meses en las plantas. La comparación de los valores medios entre tratamientos se hizo a través de una prueba de Tukey, a un nivel de significancia del 95%.

## RESULTADOS

**Altura.** Los mayores valores de crecimiento en altura del experimento se presentaron en el tratamiento tp0 (8.5 cm), plantas no podadas. El tratamiento MP25 representó el segundo lugar en altura que fue de 8.2 cm, que es de considerar, por tratarse de plantas podadas al 25%, e indica que lograron sobreponerse muy rápidamente (un mes) a la pérdida del follaje apical, emitiendo brotes laterales que posteriormente tomarán la dominancia del crecimiento, lo que se observó a lo largo del experimento. Los tratamientos micorrizados con poda (mp25, mp50) mostraron la tendencia de rápida respuesta (Figura 1a). La diferencia entre las medias de la primera y segunda mejor altura es estadísticamente significativa, no así entre la segunda y tercera. Los tratamientos podados sin micorrizar no mostraron esa respuesta de crecimiento inmediato. El tercer tratamiento en altura fue el micorrizado sin poda (mp0), que al igual que el primero (tp0) no sufrió reducción alguna en el área foliar y por lo tanto, una altura final considerable de 7.6 cm. En orden descendente los tratamientos subsecuentes son tp25, mp50 y tp50. Lo anterior puede explicarse en términos de la micorrización, ya que la asociación simbiótica, es importante en el incremento de la absorción de fósforo y otros nutrientes de escasa movilidad en el suelo. Este aumento en la absorción es debido generalmente a un crecimiento del área de absorción de la raíz (Roussaeu *et al.*, 1994). Ocampo (1990) trabajando con *Pinus caribea* var. *hondurensis* en sustrato micorrizado encuentra un comportamiento similar y a favor de las plantas inoculadas.

**Diámetro.** El tratamiento con mayor valor de la variable fue el mp0 con 3.36 mm, quizá debido al hecho que se trataba de plantas con un adecuado desarrollo radical que no sufrieron la poda, por lo tanto, su crecimiento fue constante. Los tres mejores diámetros corresponden a los tratamientos micorrizados (Figura 1b), lo que podría interpretarse como resultado de la influencia de la sim-

biosis fúngica, ya que la asociación micorrízica favorece al fitobionte a través de una mayor absorción de nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo que la planta utiliza en la fotosíntesis, produciendo azúcares que se almacenan en el tallo de la planta, entre otras estructuras (Peñuelas y Ocaña, 1996). Para esta variable no se manifiestan diferencias significativas entre los valores medios de todos los tratamientos al final del experimento. Quiñones (1991), inoculando una dosis de 81.7 mg/l suelo de *Pisolithus tinctorius* en *Pinus cembroides*, al cabo de 20 meses observa mayores crecimientos en el diámetro de plantas inoculadas, aunque concluye que la dosis de inoculación no es proporcional a la mayoría de las variables involucradas en su estudio.

**Área foliar.** En cuanto a la velocidad de recuperación del área foliar el tratamiento tp25 es el que mostró una mejor respuesta, ya que éste al segundo mes de haberse eliminado el 25% del tallo, casi había igualado el área foliar inicial. Los tratamientos micorrizado, por el contrario, después de tres meses de aplicada la poda, aún no alcanzaban el área foliar con que se había iniciado la observación, lo cual podría explicarse a través de las prioridades de demanda dentro del árbol. Waring y Schlesinger (1985) señalan que, en condiciones naturales de crecimiento en el bosque, la copa de los árboles representa la principal demanda de reservas. Considerando que en el experimento se incorporó un factor más de demanda, la asociación simbiótica, que tarda de ocho a más semanas en establecerse (Ruele, 1977; citado por Iglesias *et al.*, 1985) y que el segundo sitio en importancia de demanda de fotoasimilados son precisamente las raíces en formación, no es de sorprender que el tratamiento tp25 recuperara y sobrepasara el área foliar inicial, mientras que el mp25 aún se encontraba en ese proceso al final del tiempo de medición del experimento. En el caso de los individuos con poda al 50% se presenta una tendencia similar entre sí. A los tratamientos se les redujo drásticamente su follaje y al final del experimento no habían recuperado el valor del área foliar inicial, aunque la tendencia siempre fue creciente, en este caso parece observarse un comportamiento inverso al antes citado con los tratamientos de poda al 25%. El comportamiento de las plantas no micorrizadas fue más lento con respecto a las inoculadas, quizá debido a la severa reducción del aparato fotosintético y a la mayor disponibilidad de nutrientes por parte de las plantas simbiotes.

Los tres mejores tratamientos respecto a esta variable fueron mp0 con 10.5 cm<sup>2</sup> de área, tp0 con 9.1 cm<sup>2</sup> y MP25 con 8.71 cm<sup>2</sup> aunque no existe diferencia significativa entre los valores medios de estos tratamientos, no así entre este grupo y los tres restantes (tp25, tp50 y mp50). La tendencia de todos los tratamientos, así como los demás resultados al respecto, se muestran en la Figura 1c. En un experimento con *Pseudotsuga menziesii*, Le Tacon *et al.* (1992) reportan mayor número de brotes

aéreos emitidos en plantas inoculadas de manera natural con *Thelephora terrestris* en Francia

**Peso seco.** En esta variable se dividieron las plantas en parte aérea y radical. Algunos índices de calidad de planta requieren de valores individuales de dichas secciones. *Peso seco radical.* En todos los tratamientos se reportó un incremento constante de la biomasa radical aunque es muy notoria la diferencia entre los tratamientos con y sin micorriza; el tratamiento mp25 acumuló 0.94g, mientras que su contraparte sin micorriza, tp25, sólo alcanzó 0.62 g, probablemente debido a que los tratamientos no micorrizados se encontraban sobreviviendo con un sistema de raíz pobre, no modificado y deficiente en raicillas absorbentes. Los tres mejores tratamientos son mp25 con 0.94 g, mp0 con 0.76 g y tp25 con 0.62 g de peso seco radical. La diferencia estadística entre éstos es significativa. El comportamiento general de la variable se muestra en la Figura 1d. El éxito de las reforestaciones depende de la capacidad de las plántulas para almacenar reservas inmediatamente, que le servirán en la siguiente estación; el crecimiento inmediato de la raíz le asegura un espacio de vida (Perry *et al.*, 1987).

**Peso seco aéreo.** Los tratamientos micorrizados mp0 y mp50 presentan valores ocasionalmente iguales entre muestreos, lo que puede sugerir una mayor demanda de reservas para el crecimiento hacia el sistema radical que hacia el follaje. El valor de peso seco aéreo de los tratamientos micorrizados, comparados con sus contrapartes no micorrizados, se muestran superiores, aunque por escasa diferencia, excepto en los tratamientos sin podar. Sin embargo, dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los resultados de los tres mejores tratamientos de esta variable son: tp0 con 0.76 g, mp0 con 0.70 g y mp25 con 0.63 g de biomasa. Los siguientes resultados de manera descendente son tp25, mp50 y tp50; sus valores y tendencias se observan en la Figura 1a.

**Longitud de la raíz.** Con relación a esta variable las plantas inoculadas mostraron mayor longitud del sistema radical, sobresaliendo el tratamiento mp50 que sobrepasa los 4.5 m de raíz en términos acumulativos del todo el sistema radical. Los demás tratamientos micorrizados alcanzaron prácticamente los 4 m de longitud. Ninguno de los individuos sin micorriza lograron alcanzar los 3.5 m. La diferencia estadística del valor medio entre los tratamientos con y sin micorriza es altamente significativa (Figura 1b).

Los hongos ectomicorrízicos promueven la bifurcación de las raicillas y el desarrollo de estructuras coraloides y estimulan el crecimiento de éstas (Wilcox *et al.*, 1974). Los primeros 10 cm de suelo superficial contienen cerca del 11% de la biomasa total de las raíces Trappe y Fogel (1977), citados por Spurr y Barnes (1982).

**Número de micorrizas.** Durante el tiempo que duró el experimento las plantas sin inoculación mostraron contagio micorrízico de una fuente desconocida; falla atribuida al manejo dentro del invernadero. En los tratamientos inoculados se observó que el mayor número de estructuras micorrízicas se obtuvo en el tratamiento mp25 con 376 unidades, después en el mp50 con 326 y posteriormente el mp0 con 239 micorrizas. Las plantas sometidas a poda parecen destinar mayor cantidad de recursos fotoasimilados hacia la raíz, lo que favorece al crecimiento y la bifurcación de raíces; las plantas micorrizadas y sometidas a poda al 25% obtuvieron mayor número de micorrizas. Estadísticamente la diferencia entre el primer y segundo mejor tratamiento (mp25 y mp50) no es significativa, no así entre estos dos con el tercero (mp0), donde la diferencia es considerable. En todos los tratamientos sin micorriza la diferencia de sus valores medios es no significativa; pero entre este grupo de plantas y las inoculadas, la diferencia si es estadísticamente considerable. El comportamiento de la variable se observa claramente en la Figura 1g, que incluyen todos los tratamientos.

**Densidad micorrízica.** En la Figura 1h se observa la tendencia de los tratamientos al respecto. Se podría decir que esta figura representa el tamaño del sistema de absorción de nutrimentos y agua de cada tratamiento. En estos términos de comparación, la diferencia entre tratamientos con y sin micorriza es visual y estadísticamente significativa, ya que la densidad micorrízica del peor tratamiento micorrizado (mp0) de más del doble del mejor tratamiento no micorrizado (tp0). La comparación de los valores medios dentro del grupo de tratamientos micorrizados es similar. El mismo comportamiento se observa dentro de los tratamientos sin inoculación. Con respecto a los tratamientos con poda y micorriza, los tratamientos moderado (mp25) y severo (mp50), obtuvieron el mismo valor de densidad micorrízica (10 mic./10 cm), ligeramente superiores al tratamiento sin intervención, mp0, (9 mic./10 cm). Por otro lado, en los tratamientos sin inoculación, fue el tratamiento con poda al 25% el que presentó el mayor valor, 4 mic./10 cm, ya que el tratamiento sin poda obtuvo una densidad de 3 mic./10 cm y el de poda al 50% sólo obtuvo 2 mic./10 cm (Figura 1h).

**Transpiración.** Los individuos micorrizados, y más aún los intervenidos con poda presentan menores tasas de transpiración; por lo tanto, en teoría fotosintetizaron menos que los no inoculados, partiendo de la relación que a mayor transpiración, mayor apertura estomática, e intercambio gaseoso (fotosíntesis). Sin embargo, no se debe perder de vista que respecto al parámetro de ganancia de peso seco, especialmente radical, los individuos del tratamiento mp25 mostraron un crecimiento comparativamente superior respecto a los no micorrizados; lo cual podría hacer suponer que el metabolismo de las plantas del tratamiento mencionado se mantuvo en

niveles relativamente bajos, pero lo suficientemente significativos para inducir biomasa subterránea.

Los tratamientos sin poda muestran una tendencia siempre ascendente en la transpiración, al igual que los máximos valores, por tratarse de plantas a las que no se les redujo el área foliar. Los tratamientos con poda y sin micorrizas experimentaron un descenso en la pérdida de agua al primer mes, seguramente debido a la pérdida de follaje, para en lo sucesivo incrementarse de manera sostenida. Por su parte los individuos micorrizados con poda no experimentaron tal descenso en su patrón de pérdida de agua, lo que puede indicar una rápida recuperación del área foliar, que es posible observar en la Figura 5 de peso seco aéreo, donde estos tratamientos mostraron una mayor y más rápida ganancia de peso con respecto a los individuos sin micorrizar. De manera similar a lo anterior, los valores de transpiración de los tratamientos mp25 y mp50 fueron exactamente iguales (Figura 1i).

**Índice de transpiración.** Los valores más altos corresponden a los tratamientos micorrizados; el mejor tratamiento sin inóculo (tp0) obtuvo un valor del índice de 0.448, mientras que el peor de los inoculados fue superior, con un valor de 0.521. Con relación a la poda, los resultados en tratamientos no micorrizados al final del experimento fueron muy similares; en contraparte en los individuos inoculados, el tratamiento mp25 muestra valores del índice considerablemente mayores a los restantes mp0 y mp50. Tal resultado es comprensible, ya que éste mostró la mayor cantidad de biomasa y la menor pérdida de agua a lo largo del experimento. La comparación estadística de los valores medios de los mejores tratamientos se manifiesta de la siguiente manera: el mejor tratamiento (mp25) es significativamente superior a los tratamientos mp50 y mp0, segundo y tercer valor respectivamente; y muy superior a los restantes (tp0, tp25 y tp50), todos sin micorriza (Figura 1j). Turner (1986), citado por Molina (1997), propone utilizar el término Eficiencia Foliar en el Uso del Agua como sinónimo de la Eficiencia en el Uso del Agua (EUA). El autor sugiere variable como un carácter de selección de plantas tolerantes a la sequía

**Índice de calidad de Dickson.** La calidad es un concepto que varía con el tiempo, por lo tanto, la estimación que se realizó en el quinto muestreo sólo refleja las condiciones de calidad de las plantas de los diferentes tratamientos, en ese momento. De acuerdo con los resultados del índice los mejores tratamientos muestran valores inferiores a 0.5, lo que indica que la calidad de las plantas en la fecha de muestreo no era buena para ningún tratamiento, o bien, que los valores de calidad para la especie oscilan en esos términos. El tratamiento mp25 reporta el valor más alto del índice, 0.471, que le significa ser una clase estadísticamente superior al tratamiento en segundo lugar, el mp0, con un valor del índice de 0.353. El tratamiento siguiente, en tercer lugar, es el tp25 y no el

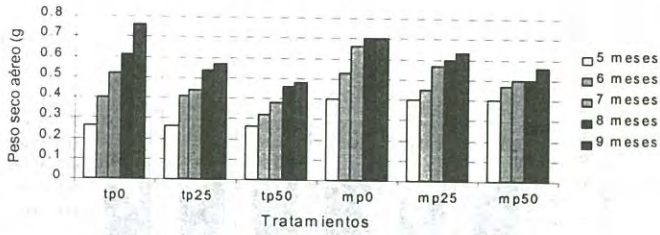
restante micorrizado (mp50), esto debido quizá a la severidad de la poda, ya que en ambos casos, con y sin micorriza, fueron los tratamientos con poda al 50% los que presentan los valores más bajos del índice. Los tratamientos en tercer y cuarto sitio (tp25, MP50) corresponden a otra clase estadísticamente diferente. Los restantes tratamientos se observan en la Figura 1k.

**Cantidad de azúcares totales en tejidos.** Los árboles sanos contienen reservas nutritivas que pueden ser utilizadas durante largos períodos de estrés (Waring y Schlesinger, 1985). Todos los tratamientos mostraron un marcado descenso de azúcares al momento del trasplante, debido seguramente al manipuleo, que además de estresar la planta al exponer sus raíces al aire, el trasplante en sí originó una poda involuntaria del sistema radical. Los tratamientos micorrizados mostraron un mejor desempeño; la curva de recuperación de las plantas al estrés de la poda, aparentemente fue más rápida, ya que los tratamientos mp0 y mp50 lograron esta recuperación al cabo del tercer mes, y sólo en el caso mp25 el restablecimiento se presentó hasta el cuarto mes. Por el contrario, los tratamientos tp25 y tp50, lograron sobreponer la tendencia negativa de la pendiente al cuarto mes, en el mejor de los casos, ya que las plantas tp0 al final del cuarto mes de observación no mostraron signos de recuperación en esta variable. Los valores finales de contenido de reservas (mg/g de peso seco) no son muy claros en los tratamientos micorrizados, ya que el segundo mejor tratamiento de todo el experimento corresponde a las plantas tp50, con 28.6 mg/gr de azúcares totales, sólo superado por el tratamiento mp50, con un valor de 29.46 mg/g. Los siguientes tercer y cuarto mejores tratamientos también corresponden a plantas inoculadas, los tratamientos mp0 y mp25 respectivamente, como se muestra en la Figura 1l. No obstante, las diferencias entre los tratamientos muestran variaciones estadísticamente significativas dentro de los tres primeros lugares.

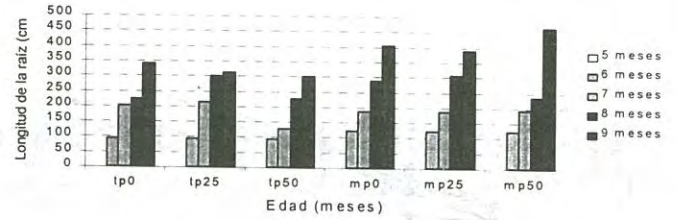
**El consorcio micorrízico.** La identificación de los hongos colectados en el bosque de pino piñonero indican la presencia de una especie del género *Clitocybe*, dos especies de *Inocybe* y una más de *Leucopaxillus*, géneros considerados micorrízicos (Guzmán, Comunicación personal, 1999).

Los hongos muestreados en el área de colecta del suelo micorrízico no necesariamente son representativos de la micoflora del sitio, ya que las poblaciones de hongos son muy irregulares en sus fructificaciones y para llegar a conocerlos completamente, se requieren años de observaciones y colectas en campo, sin embargo, podemos afirmar que la inoculación de las plantas del experimento se realizó con los hongos micorrízicos antes mencionados, sean estos o no, parte del consorcio general micobiótico del bosque seleccionado (Guzmán, Comunicación personal, 1999).

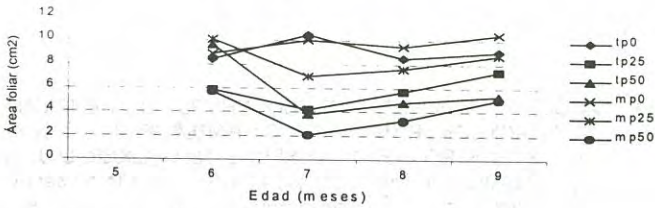
a)



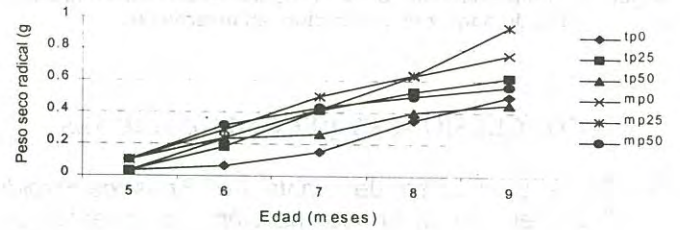
b)



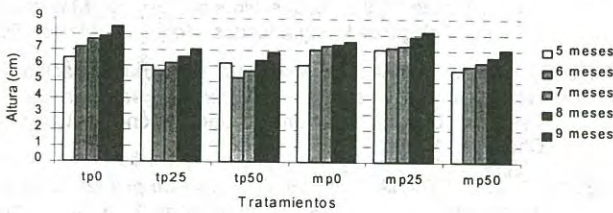
c)



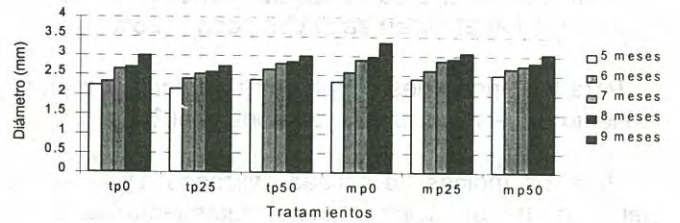
d)



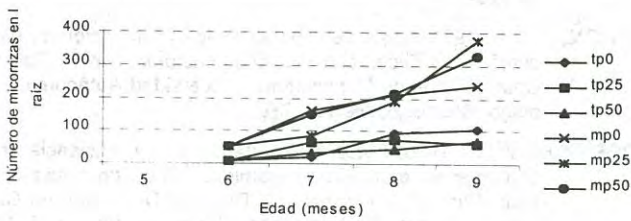
e)



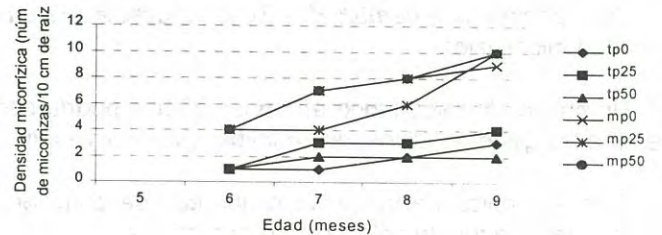
f)



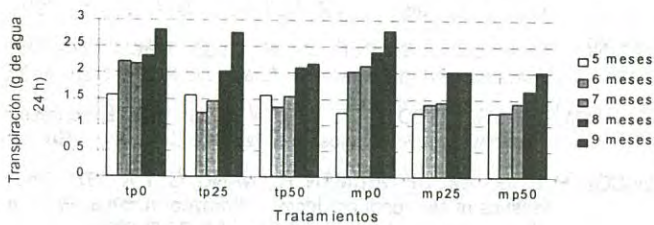
g)



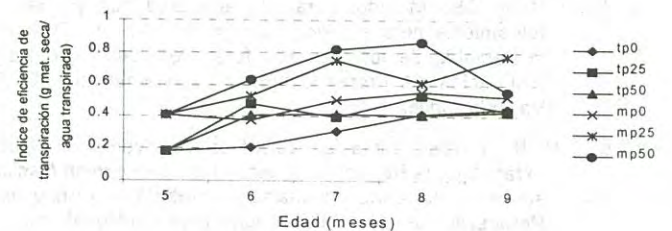
h)



i)



j)



adversos, se requiere tener un buen control en la producción y efectuar fertilizaciones con el tipo de elemento nutritivo en las dosis adecuadas a las necesidades de cada una de las especies, con la finalidad de reducir el tiempo de mantenimiento y proporcionarles así, las características deseables de vigor y calidad a las plantas. A través de esta investigación se pretende: 1. Evaluar la influencia del volumen de sustrato y de la dosis de fertilización en el desarrollo de *Cupressus guadalupensis* S. Wats.; 2. Determinar el volumen de sustrato más adecuado para el desarrollo; y 3. Determinar la dosis de fertilización dentro de los distintos volúmenes de sustrato para la adecuada producción de planta en vivero. Descansa en las hipótesis de que se presentan diferencias en el desarrollo y vigor de la especie con diferentes cantidades de nutrimentos contenidos en el sustrato. Igualmente, se parte de los supuestos de que el tiempo bajo el periodo de mantenimiento del experimento permitirá observar las diferencias en el desarrollo y vigor de las plantas con distinto tamaño de envase y con diferentes cantidades de nutrimentos contenidos en el sustrato, además que el desarrollo y vigor observado en las plantas es producto de las diferencias en el tamaño de envase y la cantidad de nutrimentos suministrados a la planta, contenidos en el sustrato.

## MATERIALES Y METODOS

El experimento se estableció en el vivero Genfor IV de Viveros y Reforestaciones Chapingo S. de R.L. de C.V., ubicado en el extremo SW de la población Boyeros, Texcoco, Edo. de México, a una altura sobre el nivel del mar de 2 250 m y un clima templado. En el experimento se utilizó material homogéneo genéticamente colectado de no más en 20 individuos en Isla Guadalupe, B.C.N.

Asimismo, se empleó planta con 1.10 m de altura promedio, previamente producida en envases de polietileno con medidas 30 x 30 cm. En el reembolso se extrajo la planta con todo el cepellón del envase para ubicarlo en el envase correspondiente, eliminando con un corte horizontal y vertical las raíces para evitar la formación de la cola de cochino. Las dimensiones del envase chico son 30 x 30 cm, del mediano 40 x 40 cm, finalmente el envase grande mide 50 x 40 cm. En la distribución de envases se pretendió que el espaciamiento fuera homogéneo para toda la planta. Se dio una fertilización con las cantidades para cada tratamiento indicadas en el Cuadro 1.

En vivero se evaluaron las siguientes variables: 1. Diámetro al nivel del suelo. Se empleó un vernier con aproximación al centésimo de centímetro. 2. Altura total. Se tomó desde el nivel del sustrato hasta la yema apical. 3. Diámetro de copa. Se tomaron dos lecturas evaluando la longitud del área de proyección de la copa, en las direcciones N-S y E-W, en la medición de las dos últimas variables se empleó una regla graduada con aproximación al milímetro. El diámetro al nivel del suelo y la altura, se midieron mensualmente en un periodo de nueve meses que va del 15 de agosto de 1997 al 15 de mayo de 1998.

Se hizo el análisis destructivo de una muestra de plantas representativas, dos por tratamiento y repetición, a las cuales se les midió: 1. Volumen radicular y aéreo. Se empleó una probeta graduada de 15 litros se sumergieron los dos sistemas obteniéndose el volumen por la diferencia final con el volumen inicial. 2. Biomasa total. Después de secar los sistemas radiculares y aéreos de las plantas a 75°C durante 96 horas. Se calculó con la siguiente expresión: Biomasa = (peso seco/peso fresco) x 100. 3. Relación parte aérea/parte radicular. Resulta de dividir el peso seco del sistema aéreo entre su correspondiente del sistema radicular.

CUADRO 1. Tratamientos que se aplicaron en el experimento sobre influencia del tamaño de envase y fertilización en el crecimiento de *Cupressus guadalupensis* S. Wats., en vivero.

Tratamiento	Volumen de sustrato (l/envase)	Fertilización (g/planta) <sup>z</sup>	
1	5	0	Envase chico
2	5	10	Envase chico
3	5	15	Envase chico
4	5	20	Envase chico
5	15	0	Envase mediano
6	15	15	Envase mediano
7	15	20	Envase mediano
8	15	30	Envase mediano
9	20	0	Envase grande
10	20	20	Envase grande
11	20	27	Envase grande
12	20	40	Envase grande

<sup>z</sup> 38-15-15 en una mezcla con 100kg de triple 17 y 50 kg de urea.

En el análisis del follaje, se obtuvieron tres muestras de follaje que incluyeron al testigo, al tratamiento intermedio y al mejor tratamiento, se determinó nitrógeno, fósforo y potasio. En la interpretación se tomaron como referencia los resultados de Will (1985). Para el análisis de sustrato, se realizaron dos muestreos uno al inicio del experimento y otro al final del mismo. Este último incluyó al testigo, al tratamiento intermedio y al mejor tratamiento, se obtuvo: pH, materia orgánica, nitrógeno, fósforo y potasio. En el segundo análisis se determinó conductividad eléctrica. Las metodologías usadas para las determinaciones fueron: pH (Davidson y Mecklenburg, 1988), MO (Fricker, 1982; Jack, 1984), CE (Richards, 1962), N, P, K (Jack, 1984).

El análisis estadístico se realizó de acuerdo con el diseño experimental jerárquico con dos factores, completamente al azar, con tres repeticiones y seis plantas por repetición. Se obtuvieron las medias para cada tratamien-



to en cada una de las variables, para generar sus respectivos coeficientes de correlación con el procedimiento CORR del paquete SAS. En la determinación de diferencias significativas se realizó el análisis de varianza empleando el procedimiento GLM de SAS.

Se requirió que imprimiera los residuales con la finalidad de conocer la normalidad de su distribución usando el procedimiento UNIVARIATE de SAS, el cual prueba la hipótesis de que los errores experimentales tienen una distribución normal. También se efectuó la prueba de Tukey en la determinación de las diferencias significativas en los dos factores de interés.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En el análisis estadístico de normalidad solamente en el volumen radicular la prueba de hipótesis detectó la no normalidad por lo cual, se le realizó una transformación logarítmica a continuación se les aplicó a los residuales la prueba de normalidad indicando que se distribuyeron normalmente (Cuadro 2); se efectuó el análisis de varianza, para su presentación los resultados se transformaron nuevamente a la escala original.

**CUADRO 2. Prueba de normalidad para las variables evaluadas en el experimento influencia del tamaño de envase y fertilización en el crecimiento de *Cupressus guadalupensis* S. Wats., en vivero.**

Variable	Estimador de $\alpha$ (Prob<W)	Probabilidad de Normalidad (%)
Crecimiento en Diámetro (CD)	0.6696**	97.5
Crecimiento en Altura (CA)	0.5885**	97.3
Crecimiento en Diámetro de Copa (CDC)	Q-7QQ5**	97.6
Volumen Radicular (VR)	0.01 10*	94.8
Volumen Aéreo (VA)	0.9312**	98.8
Biomasa Total (BT)	0.3431**	97.3
Relación Parte Aérea/Radicular (RPA/R)	0.9809**	99.1

\*Altamente significativo con  $\alpha = 0.01$  \*\*significativo con  $\alpha = 0.05$

El pH fue alcalino mismo que ocasiona la poca disponibilidad de fierro, manganeso, zinc. No existe relación entre el pH y los tratamientos muestreados. El pH inicial fue mayor al pH final (Cuadros 3 y 4), lo cual es debido a que transcurrieron nueve meses desde la primera medición y la final normalizándose cualquier alteración causada por la fertilización, además el 30% de este tiempo correspondió a la temporada de lluvias.

**CUADRO 3. Análisis químico del suelo utilizado como sustrato al inicio del experimento para determinar la influencia del tamaño de envase y fertilización en el crecimiento de *Cupressus guadalupensis* S. WATS., en vivero.**

Tratamiento	pH	MO	N	P	k
Testigo	8.96	6.25	3.36	52.06	1752
T6	9.46	6.32	32.76	81.97	1872
T12	8.54	5.42	62.16	53.19	1608
Promedio	8.99	6.00	32.7p	62.41r	1744mr

MO=materia orgánica; mp=muy pobre; p=pobre; a= apropiado; r=rico; mr=muy rico

En el Cuadro 4, la conductividad eléctrica no muestra una tendencia de aumento en relación con los tratamientos. El contenido de materia orgánica se encuentra arriba de los niveles sugeridos en viveros forestales por Fricker (1982) como mínimo 4%, por Jack (1984) entre 1.5 a 3%. De los Cuadros 3, 4 y 6 se deduce que los tratamientos favorecieron de manera proporcional la absorción de nitrógeno, fósforo y potasio para el desarrollo de las plantas.

**CUADRO 4. Análisis químico del suelo utilizado como sustrato al final del experimento para determinar la influencia del tamaño de envase y fertilización en el crecimiento de *Cupressus guadalupensis* S. WATS., en vivero.**

Tratamiento	PH	CE DS/m	MO	N	P	K
Testigo	8.40	0.9	6.02	9.27mp	60.9	708mr
T5	8.42	0.58	4.75	7.56mp	94.3r	1272mr
T10	8.28	0.86	6.34	6.72mp	151mr	1260mr

CE=conductividad eléctrica; mp=muy pobre; p=pobre; a=apropiado; r=rico; mr=muy rico

En el Cuadro 7 se observa que el tamaño de envase presenta una influencia altamente significativa en el crecimiento en diámetro, con el tamaño de envase grande, se tuvo un crecimiento medio de 0.316 cm siendo el más alto (Cuadro 8). Vemos que un aumento en diámetro se refleja en mayor altura, mayor diámetro de copa, mayor volumen aéreo (Cuadro 5).

**CUADRO 5. Coeficientes de correlación lineal simple y probabilidad de significancia para cada una de las variables que se midieron en el experimento influencia del tamaño de envase y fertilización en el crecimiento de *Cupressus guadalupensis* S. WATS., en vivero.**

	CD	CDC	VR	VA	BT	RPA/R
CA <sup>2</sup>	0.7340**	0.2874*	0.0716	0.4271**	-0.4260	0.0377
	0.0001	0.0144	0.5503	0.0002	0.0002	0.7532
CD		0.2348*	0.2733*	-0.4621**	-0.3842	-0.0714

para plantaciones está limitada por la baja viabilidad de la semilla que dura apenas 15 días y tienen un porcentaje de germinación aproximado del 47 %. De las plantas que logran germinar, el 20 % muere en vivero, lo cual provoca la falta de planta para realizar las plantaciones en superficies extensas (Geilfus, 1989).

El nombre genérico "Nim" viene de la palabra persa que quiere decir "El árbol noble" (Keshava, 1991). El árbol del Nim es originario de la parte tropical del sudoeste asiático, especialmente de la India y Birmania, donde tiene siglos siendo utilizado como especie medicinal y de ornato. Es considerado como una planta forestal que crece rápidamente y es excepcionalmente resistente a la sequía. Ha sido promovido por varias décadas por organizaciones internacionales como abastecedor de madera y/o carbón en las zonas áridas de Asia, África y desde hace algún tiempo en América Latina (Cruz, 1993). El Nim es nativo del subcontinente Indo-Pakistaní; otros atribuyen su origen a zonas secas de la India, Pakistán, Sri Lanka, Malasia, Indonesia, Tailandia y Bangladesh y Burna. En África el árbol del Nim se encuentra distribuido en Nigeria y Sudán; también en la costa del Este, desde Etiopía, pasando por Somalia, Kenia, Tanzania y Mozambique; y en el Oeste de África, Mauritania, Togo, Costa de Marfil y Camerún. Ha sido introducido a naciones del Caribe, en Trinidad y Tobago, Jamaica, Surinam, Guayana y Barbados como planta medicinal (Ahmed y Grainge, 1986).

Existen abundantes plantaciones en Guatemala, Bolivia, Ecuador, Honduras, Argentina, Brasil, Cuba, Nicaragua, República Dominicana y en Haití. De manera experimental lo cultivan en Puerto Rico, USA y ahora en México (Ahmed y Grainge, 1986).

Es un árbol siempre verde, es decir que no pierde sus hojas en ninguna época del año, de una altura de 15-20 m, con una copa redondeada, con ramas ampliamente extendidas; los cogollos u hojas jóvenes son de color rojo cobrizo y posteriormente se tornan en un verde oscuro. Desarrolla una raíz principal de rápido crecimiento; sus raíces laterales pueden tener hasta 15 m de longitud, se reporta que vive más de 200 años (Cruz, 1993). Crece normalmente en todas las zonas bajas tropicales, desde los 50 msnm hasta aproximadamente los 1 500 msnm (Geilfus, 1989). Tiene un buen desarrollo a los 25°C, aunque puede resistir temperaturas extremas desde 0°C hasta los 49°C, admite altas temperaturas pero es muy sensible al frío (Johnson, 1993). Es resistente a la sequía extrema y aridez, creciendo aún con 130 mm de precipitación anual; el rango óptimo es de 450-750 milímetros anuales (Vera, 1994). Sin embargo, Del Real *et al.* (1995) mencionan que el rango óptimo de crecimiento se encuentra entre 800 y 1 800 mm anuales.

Una de las áreas de la biotecnología es el cultivo *in vitro*; mediante esta técnica se puede obtener gran cantidad de árboles de Nim para su propagación. Con base en lo anterior, se procedió a realizar este estudio tendien-

te a lograr una técnica en micropropagación en esta especie, con el fin de contar con un método que permita la propagación masiva del árbol del Nim.

Existen múltiples usos del Nim, puesto que casi todas las partes del árbol se utilizan; además de los usos que se citan a continuación (Jacobson, 1989):

Insecticida	Forrajes	Ornamental
Nematicida	Cortina rompeviento	Sistemas agroforestales
Fungicida	Cercos vivos	Forestal
Bactericida	Recuperador de suelo	Energía
Medicina human	Maderable	Anticonceptiva
Medicina veterinaria	Leña	Valor cultural
Cosméticos	Controlador de la erosión	Carbón
Abono orgánico	Sombra	

**Insecticida.** El Nim contiene 49 sustancias activas y son tres las principales que son utilizadas para el control de insectos (Jacobson, 1989):

1) Azadirachtin: Inhibe el crecimiento y altera la metamorfosis, causa deformaciones y esterilidad en los insectos. Se encuentra en las semillas. 2) Nimbin: Tiene efectos repelentes y antialimentarios en insectos; se encuentra en semillas, corteza y madera. 3) Salanin. Es antialimentario, inhibe la formación de quitina, es repelente y afecta la comunicación sexual de insectos. Se encuentra en las semillas.

Formulaciones de azadiractina tales como Benefit®, BioNim®, Margosan-O™, y Azatin™ son etiquetadas como controladores de áfidos, gusano soldado, orugas, zancudos, escarabajos de la hoja del olmo, grillo de campo, saltamontes, polilla, larva de los esfingidos, saltarilla, mosca de sierra de pino, gusano de abeto, mosca blanca en terrenos abiertos, ornamentales, árboles y arbustos. El margosan-O ha sido registrado para el uso contra la mosca blanca en crisantemos, minador de la hoja en abedules, polilla en árboles de sombra y trips en gladiolas (NRC, 1992).

**Anticonceptivo.** Se están estudiando las posibilidades de extraer de la semilla del Nim un anticonceptivo; ya que se ha encontrado que puede funcionar como un espermaticida (National Academy Press, 1993). En otro estudio realizado en changos y humanos, se utilizó aceite de Nim sin diluir antes del coito y resulto 100 % efectivo (Amhed y Grainge, 1985; 1986).

**Medicina veterinaria.** El aceite de Nim así como el extracto acuoso de las semillas se utiliza para el control

de la garrapata y moscas del ganado; el extracto tiene un efecto repelente. También sirve para controlar las pulgas y la sarna en los perros (Cruz, 1993). Algunas posibilidades de uso en el campo de la veterinaria son para el control de insectos, tales como la mosca del cuerno, la mosca zumbadora, y la mosca picante. Así como el combate de bacterias como el *Staphylococcus aureus* la cual causa mastitis en la vacas, también la *Salmonella bacterium* que es abortiva en caballos, en ganado vacuno y carnero, También se pueden controlar lombrices intestinales del ganado (National Academy Press, 1993).

**Agricultura.** En Sri Lanka, por ejemplo, el humo de las hojas de Nim se usa como fumigante botánico. En Filipinas, extracto y polvos de la semilla del Nim se usan para el tratamiento de granos de arroz (Jacobson, 1989). Un problema general con los fumigantes es la reinfestación después de la fumigación. Al respecto, el Nim ha probado ser mejor que cualquier otro fumigante. Por ejemplo, en granos no fumigados hubo un 12 % de infestación de plagas, 5 a 6 % de infestación con otros fumigantes y sólo 3 % de infestación con el fumigante de Nim, ocho meses después de la fumigación (Grossman, 1995).

**Agroforestal.** En combinación con la agricultura, el Nim se puede usar de diversas maneras (Johnson, 1993):

1) Asociaciones: es un árbol muy competitivo y difícil de intercalar con otros cultivos, ya que termina desplazándolos; sin embargo, se han logrado avances en algodón, frutales, mijo, forrajes, cacahuate, frijol y sorgo, siempre y cuando menos del 20 % sean árboles del Nim. 2) Tutor: ECOSTA<sup>1</sup> realiza pruebas para poder utilizar al Nim como tutor de vainillales. 3) Como no tira las hojas, el Nim proporciona excelentes resultados al usarse como cortinas rompevientos y se planta para sombras en potreros.

**Forraje.** Las hojas verdes son utilizadas en la India como forraje para ganado en la estación seca; contiene 13-15 % de proteínas y de ellas el 50 % son digestibles. Un árbol adulto puede producir 350 kilogramos al año. La pasta puede darse a razón de 10 % de la dieta de los bovinos, y 5 % de las gallinas; contiene de 12 a 17 % de proteína cruda (Rodríguez, 1994).

**Madera.** El árbol del Nim está emparentado con la caoba y el cedro rojo que pertenecen a la familia de las Meliaceae y su madera se asemeja a la de la caoba cubana. Es resistente a la pudrición y a los insectos (termitas) y es más fuerte que la teca. Es excelente para construcción, para postes y para confección de muebles. En República Dominicana han demostrado que se obtienen buenos muebles a partir de árboles de 3 ó 4 años de edad. En la ebanistería las ramas son utilizadas para la fabricación de utensilios de cocina o artesanías (Vera, 1994).

**Leña.** El Nim se ha usado para leña en la India y África desde hace mucho tiempo. Se ha convertido en la especie más importante para plantaciones en el Norte de Nigeria. La madera es relativamente pesada, tiene un peso específico entre 0.56 y 0.85 (promedio de 0.68) (Geilfus, 1989).

**Abono orgánico.** El Nim puede ser utilizado como un excelente abono orgánico, ya que las raíces del árbol son capaces de extraer nutrimentos de las capas del suelo más profundas y ponerlos a disposición en las capas superficiales a través de sus hojas, ricas principalmente en calcio y magnesio. Además, la pasta que se deriva de la extracción del aceite puede ser utilizada para las plantas en el jardín o en el huerto (National Academy Press, 1993).

**Energía.** Las semillas de esta especie contienen hasta el 40 % de aceite, el cual se utiliza como combustible en lámparas y como lubricantes para maquinaria. Se cree que la pulpa que rodea a la semilla es un substrato prometedor para la producción de gas metano (Vera, 1994).

**Industrial.** El aceite de Nim se considera como el producto comercial más importante; el rendimiento de aceite es hasta del 50 % del peso de la semilla. Este aceite es muy usado en lámparas, jabones y otros productos. Se caracteriza por ser generalmente amargo, oscuro y oloroso. Los polvos se utilizan como componente de cremas faciales. El aceite de Nim purificado es utilizado en la elaboración de barniz de uñas y otros cosméticos (Ahmed y Grainge, 1986).

**Ecológico.** A nivel ecológico el Nim es utilizado en muchos países para resolver diversos problemas como la recuperación de suelo, retención de agua, protección contra la erosión, reforestación, cortina rompevientos y sombra (Geilfus, 1989).

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo en Chapingo, Estado de México. Las semillas utilizadas para la obtención de material vegetativo del Nim se importaron del Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales de León, Nicaragua. Para su germinación se emplearon 3 tipos de sustratos (tierra de monte, arena y tezontle), en el vivero del Departamento de Bosques de la UACH.

Después de 12 semanas de haber germinado las semillas, de las plantas obtenidas se tomaron tanto los ápices como secciones de tallos con yemas axilares para la obtención de explantes y poder establecer la primera etapa del cultivo de tejidos.

<sup>1</sup> ECOSTA: Organización no Gubernamental, ubicada en el municipio de Tututepec, Oaxaca.

## Ensayo de germinación en vivero

Se utilizaron 100 semillas para cada sustrato (tierra de monte, arena y tezontle) con 5 repeticiones para conocer la capacidad germinativa de la semilla y a su vez conocer que tipo de sustrato es el mejor para propagar el Nim. Con este propósito, se utilizaron charolas de 70 x 50 cm con una altura de 9 cm con los sustratos previamente esterilizados. No se eliminó la cubierta de la semilla y estas fueron sembradas a una profundidad de 4 cm. En cada tipo de sustrato se evaluó el número de semillas germinadas a los 50 días, con lo cual se calculó el porcentaje de germinación; también se determinó el porcentaje de semillas muertas o vanas. Después de la germinación, se realizó trasplante anticipado (Pimentel, 1996) en bolsa forestal para llevar las plantas a las áreas de crecimiento. El diseño experimental empleado durante el ensayo de germinación fue completamente al azar con 3 tratamientos y 5 repeticiones cada uno, para un total de 15 unidades experimentales.

## Establecimiento del cultivo aséptico

De las semillas que germinaron en el vivero se extrajeron los ápices y segmentos de tallo. Dicho material se introdujo a una solución con detergente comercial para poder trasladarlo al laboratorio e iniciar su desinfección. En el laboratorio se lavaron y cepillaron con detergente varias veces los ápices y secciones de tallo con yemas axilares y pecíolos de hoja, y se colocaron en agitación en un recipiente con gotas de tween-20 durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron los inóculos con agua esterilizada y se mantuvieron en solución antioxidante (ácido ascórbico 100 mg L<sup>-1</sup> y ácido cítrico 150 mg L<sup>-1</sup>) en un vaso de precipitado hasta el momento de la siembra.

Se cortaron segmentos de tallo de 1.5 a 2 cm de longitud con 2 yemas axilares cada uno, sembrando cada segmento en tubos de ensayo de 25 x 150 mm con 15 ml de medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) (1962) al 100 %. Se taparon con tapones de polipropileno y se sellaron con parafilm. El diseño experimental utilizado fue un arreglo factorial 3 x 3 (9 tratamientos) resultado de la combinación de tres tiempos de desinfección con hipoclorito de sodio al 15 % con tres tiempos de alcohol al 10 %, en un diseño completamente al azar con 20 repeticiones, para un total de 180 unidades experimentales. El período de incubación fue de 45 días tomándose datos semanales. El análisis estadístico se realizó con los datos obtenidos a los 45 días de desarrollo. La variable a evaluar fue la presencia de contaminación por hongos o bacterias.

## Multiplicación de brotes

El material resultante de los bioensayos de la etapa I para obtener los explantes libres de patógenos, se tras-

plantó a medios de cultivo para promover multiplicación de los propágulos. Se utilizaron segmentos de tallos de 1 a 1.5 cm de longitud con dos o tres yemas axilares.

Tanto las yemas axilares y ápices de tallo fueron sembradas *in vitro* con el propósito de estimular la brotación. Para ello se probaron las citocininas Benziladenina (BA), Kinetina y 2, isopentil amino purina (2ip) en forma aislada, en un rango de concentraciones de 0.0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, mg L<sup>-1</sup>. Se utilizó la solución básica del medio de cultivo MS, complemento con 3 % de sacarosa y 0.4 % de tiamina. En los 3 experimentos se utilizó un diseño completamente al azar con 5 tratamientos y 10 repeticiones para cada tratamiento de citocininas dando un total de 50 unidades experimentales por experimento. El período de incubación fue de 45 días, tomándose datos cada 15 días. Las variables que se evaluaron en este ensayo fueron el número de brotes (se contabilizó el número de brotes totales por explante), longitud de brotes (en centímetros en promedio por tubo), grosor del tallo (mm), número de yemas (se contabilizó el número de yemas por brote) y la formación de callo (se cuantificó el peso fresco de callo formado en g).

Con base en las curvas de crecimiento obtenidas manualmente en los experimentos anteriores, se plantearon experimentos adicionales con el propósito de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y nitratos. Se utilizó como fuente de carbohidratos a la sacarosa (azúcar de mesa) en tres concentraciones: 3, 6 y 9 % y se probaron las siguientes concentraciones de nitratos: al 100, 200 y 250 %. En esta ocasión se añadió al medio básico MS con tiamina al 0.4 %. La toma de datos se realizó durante 45 días de incubación. En este ensayo se utilizó un diseño experimental completamente al azar con una distribución factorial completo (3 x 3) con 10 repeticiones dando, un total de 90 unidades experimentales. Las variables que se evaluaron en este ensayo fueron el número de brotes (se contabilizó el número de brotes totales por explante), longitud de brotes (cm), el grosor del tallo (mm), el color de las hojas (amarillo, verde claro y verde oscuro), el número de yemas (se contabilizó el número de yemas por brote) y la formación de callo (cantidad de callo formado en g).

## Inducción de embriogénesis

Los mejores tratamientos que formaron callo en la Etapa II se utilizaron para inducir embriogénesis somática. Para ello se tomaron las mejores masas de células y se sometieron a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (ácido giberélico, extracto de malta y benziladenina) en un medio MS. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con una distribución factorial 3 x 3 x 5, para un total de 45 tratamientos y 5 repeticiones, dando un total de 225 unidades experimen-

tales. Las variables evaluadas fueron el número de brotes (se contabilizó el número de brotes formados por callo y formaciones globulares (se contabilizó el número de formaciones globulares por unidad experimental). La toma de datos se realizó durante 45 días de incubación.

Los embriones que se formaron en el ensayo anterior se utilizaron para montar este experimento que consistió en ponerlos a germinar en un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) sólido al 100 y al 50 %, al que se añadió 0.4 y 0.2 % de tiamina y mio-inositol (100 y 50 mg L<sup>-1</sup>) respectivamente, sometiéndolos a diferentes concentraciones de AG<sub>3</sub> (0.0, 0.1, 0.3, 1.0, y 3.0 mg L<sup>-1</sup>). En este ensayo se utilizó un diseño experimental completamente al azar con una distribución factorial (2 x 5) para 10 tratamientos con 5 repeticiones, dando un total de 50 unidades experimentales con 10 embriones por unidad experimental. La variable evaluada fue el número de embriones germinados.

### Enraizamiento de brotes

Los brotes resultantes de la Etapa II se trasplantaron a medios de cultivo para enraizamiento. Los brotes se sembraron en un medio MS básico con citocininas y auxinas. El cultivo se mantuvo en la sala de incubación durante 45 días, tomándose lecturas cada 2 semanas. Se utilizaron como fuente de citocininas a la benziladenina (BA) y como fuente de auxinas al ácido indolacético (AIA) en concentraciones de 0.0, 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 mg L<sup>-1</sup> en cada caso. El medio de cultivo utilizado fue el MS con 0.4 % de tiamina y 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol. En esta etapa se utilizó un diseño experimental completamente al azar con una distribución factorial completo (5 x 5) con 25 tratamientos y 10 repeticiones, dando un total de 250 unidades experimentales. Las variables evaluadas fueron el número de raíces (se contabilizó el número de raíces totales por explante), la longitud de la raíz (longitud de las raíces en promedio en centímetros), y la formación de callo (se contabilizó el peso fresco del callo formado en gramos).

### Transplante a suelo de las plantas obtenidas *in vitro*

Las mejores plantas obtenidas en la Etapa III, con mayor número de raíces y vigor, se trasplantaron en bolsa forestal al invernadero controlando todos los factores ambientales, principalmente la humedad relativa, la temperatura y la intensidad de luz. El sustrato que se utilizó fue tierra de monte y vermiculita previamente esterilizados, en una proporción de 3:1 (volumen). Se trasplantaron un total de 50 plántulas a invernadero. En este caso solo se determinó el porcentaje de supervivencia.

Las plántulas obtenidas *in vitro* fueron trasplantadas a bolsas de polietileno de tamaño forestal conteniendo

una mezcla de 70 % de tierra de monte y 30 % de Peat moss. Para conservar una alta humedad relativa en el medio que rodea a la planta, a cada planta se le cubrió con una bolsa de polietileno transparente, así fueron mantenidas durante un período 30 días. Diez días después del transplante, las bolsas de polietileno fueron perforadas para que las plantas fueran adaptándose a menor humedad relativa. Después de 20 días de trasplante al suelo, las plantas fueron llevadas a condiciones de invernadero con 50 % de sombra, pero la maceta aún conservaba la cubierta de polietileno. Después de 10 días de que se trasladaron al invernadero, se eliminó la cubierta de polietileno y continuaron en condiciones de media sombra. Se tomaron datos de altura de planta, número de hojas y porcentaje de supervivencia de las plantas. Sin embargo, a estos datos no se le realizó ningún análisis estadístico.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Germinación en vivero

La emergencia de las plántulas se inició a los 15 días de sembrada la semilla, en los sustratos que respondieron más rápidamente (tierra de monte y arena). A los 45 días se completó la germinación en el otro sustrato (tezontle).

De las 1 500 semillas que se colocaron a germinar en los diferentes sustratos, sólo germinó el 6 %, lo cual indica que el porcentaje de germinación es sumamente bajo en esta especie (Figura 1). Lo anterior puede deberse al bajo porcentaje de viabilidad que tienen las semillas del Nim; según Benge (1988), la semilla permanece viable sólo durante un periodo menor a los dos meses; el porcentaje de viabilidad después de 3 semanas de recolectadas es de alrededor de 18 %. A pesar del bajo porcentaje de germinación observado en todos los sustratos el análisis de varianza (ANOVA) mostró que existen diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre ellos. Se observó que el mayor porcentaje de germinación (4 %) se registró en el sustrato de tierra de monte, reduciéndose al 1 % en los otros dos sustratos arena y tezontle.

Los resultados del ensayo de germinación nos indican que la viabilidad de la semilla después de 8 semanas de recolectadas es sumamente bajo por lo que la propagación del árbol del Nim por medio de semilla es relativamente complicada, sobre todo si la semilla es de importación y lleva tiempo el traslado de la semilla del país de origen a México. De acuerdo a los resultados, la especie tiene una mayor capacidad de germinación en un sustrato como la tierra de monte que presenta una mayor compactación, obscuridad y retención de humedad en relación con el tezontle y la arena.

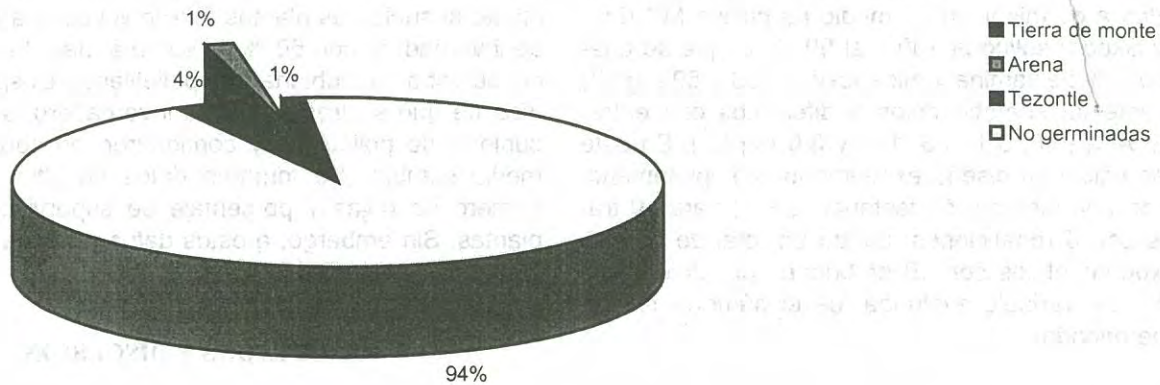


Figura 1. Porcentaje de germinación de semillas de Nim en vivero.

**Establecimiento del cultivo aséptico**

El análisis de varianza mostró que una esterilización durante 10 minutos con el hipoclorito de sodio al 15 % y de 2 minutos con alcohol al 10 % es necesaria para obtener el explante libre de patógenos. Con este tratamiento se obtuvo un 90 % de material sin contaminación; es decir, libre de patógenos. El 10 % restante se empezó a

contaminar a los 10 días de sembrado. Cuando el periodo de exposición al alcohol se redujo a un minuto, se obtuvo un 50 % de contaminación a los 5 días de sembrado el material, principalmente por bacterias; del 50 % restante, el 30 % se contaminó a los 10 días de sembrado. A las 3 semanas se tenía sólo un 20 % de material libre de patógenos (Figura 2).

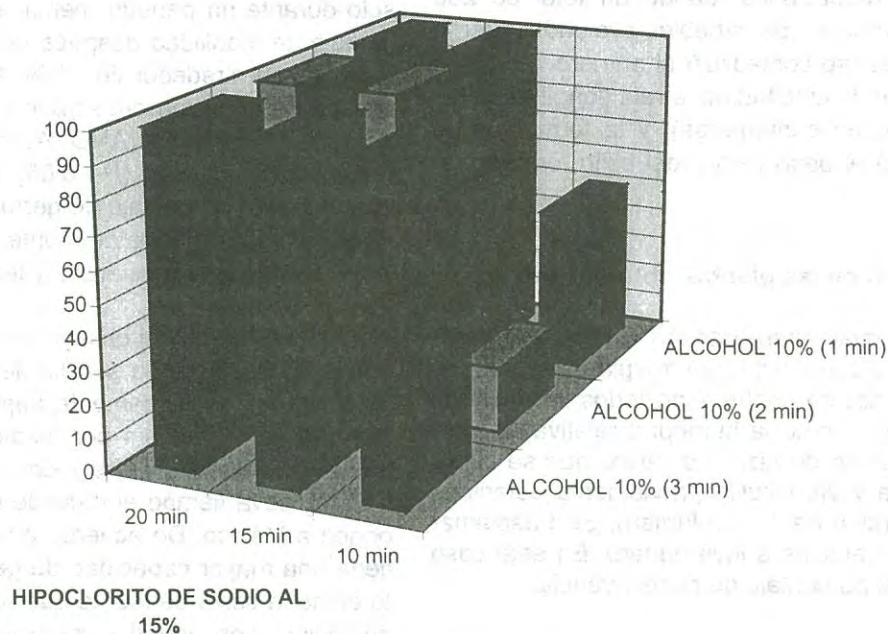


Figura 2. Porcentaje de contaminación en explantes del Nim.

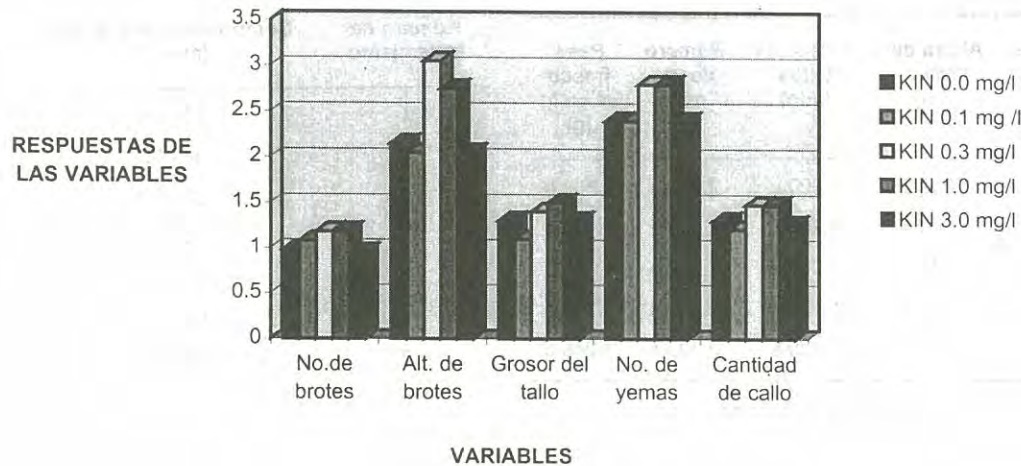


Figura 3. Efectos de la concentración de kinetina en el medio de cultivo sobre la multiplicación de propágulos de Nim.

### Multiplicación de brotes

#### Efecto de benziladenina (BA) en la multiplicación de propágulos

La concentración de BA en el medio de cultivo afectó en forma significativa ( $P \leq 0.05$ ) el número y altura de los brotes, así como el peso fresco de los callos originados a partir de los explantes cultivados *in vitro*, pero no el número de yemas ni el grosor del tallo a los 45 días de incubación. Al analizar la comparación de medias se observó que las concentraciones de 0.3 y 0.1 mg L<sup>-1</sup> de BA fueron las mejores en cuanto a la altura de brotes y peso de callo; en el caso del número de brotes el mejor tratamiento fue el de 0.3 mg L<sup>-1</sup>. Siempre que se notó alguna diferencia entre tratamientos estuvo presente el tratamiento de 0.3 mg L<sup>-1</sup> (Cuadro 1).

CUADRO 1. Valores promedio de diferentes variables relacionadas en la multiplicación de brotes al agregar diferentes concentraciones de BA al medio de cultivo MS al 100 % a los 45 días de incubación.

Niveles de BA mg/L <sup>-1</sup>	No. de brotes	Altura de brotes (cm)	Grosor de tallos (mm)	Número de yemas	Peso fresco de callo (g)
0.0	0.790 b	1.400 a	1.300 a	2.200 a	1.170 b
0.1	1.050 b	4.000 a	1.300 a	2.800 a	1.530 ab
0.3	1.570 a	2.800 a	1.500 a	2.900 a	1.740 a
1.0	0.790 b	1.400 b	1.300 a	2.200 a	1.110 b
3.0	0.790 b	1.400 b	1.600 a	2.200 a	1.180 b

$\alpha = 0.05$  NS no significativo \* Estadísticamente significativo. Medias con la misma letra en una misma columna no presentan diferencias significativas entre ellas.

#### Efecto de la kinetina (furfuril aminopurina) en la multiplicación de propágulos

A diferencia de lo ocurrido con BA, el análisis estadístico nos mostró que existieran diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos en ninguna de las variables analizadas (número de brotes, altura de brotes, grosor de tallo, número de yemas y gramos de callo). Sin embargo, si comparamos las medias de respuesta de cada variable entre los tratamientos de kinetina podemos observar que se obtuvieron buenas respuestas, y que en general existe una curva de respuesta similar con los mayores valores promedio en los niveles intermedios de kinetina (Figura 3).

#### Efectos del 2ip ( $\gamma, \gamma$ -Dimethylallylamino purine) en la multiplicación de propágulos

El número promedio de brotes de los explantes varió desde 0.9 hasta 2.1 a los 45 días de incubación; el mayor número de brotes se presentó en el tratamiento 3, que contenía 0.3 mg L<sup>-1</sup> de 2ip, superando en gran medida al resto de los tratamientos. Al utilizar concentraciones de 2ip mayores de 1 mg L<sup>-1</sup> se observó una inhibición en el desarrollo de brotes, hasta valores similares a los del tratamiento testigo. Se encontraron diferencias entre los niveles de 2ip en la formación y crecimiento del callo a los 45 días de incubación. El mayor tamaño del callo se obtuvo con una concentración de 1.0 mg L<sup>-1</sup> (con una media de 2.73 g) superando a los demás tratamientos. La altura promedio de brotes fluctuó de 1.4 a 2.2 cm; el número de yemas por explante fluctuó entre 2.3 y 3.2, y el grosor de tallo entre 1.1 y 1.4 cm. A pesar de que no hubo diferencias significativas en estas variables, las dosis intermedias entre 0.1 y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de 2ip presentaron los mayores valores promedio (Cuadro 2).

**CUADRO 2.** Valores promedio de diferentes variables relacionadas con la multiplicación de brotes al agregar diferentes concentraciones de 2ip al medio de cultivo MS al 100 % a los 45 días de incubación.

Niveles de 2ip mg/L <sup>-1</sup>	No. De brotes	Altura de brotes (cm)	Grosor de tallos (mm)	Número de yemas	Peso fresco de callo (g)
0.0	1.080 b	1.600 a	1.000 a	2.300 a	1.350 b
0.1	1.210 b	1.900 a	1.200 a	2.600 a	1.420 b
0.3	2.170 a	2.200 a	1.200 a	3.200 a	1.320 b
1.0	1.210 b	1.700 a	1.400 a	2.600 a	2.730 a
3.0	0.950 b	1.400 a	1.100 a	2.300 a	1.240 b

α= 0.05 NS no significativo \* Estadísticamente significativo

Medias con la misma letra en sentido vertical no presentan diferencias significativas.

**Inducción de embriogénesis somática**

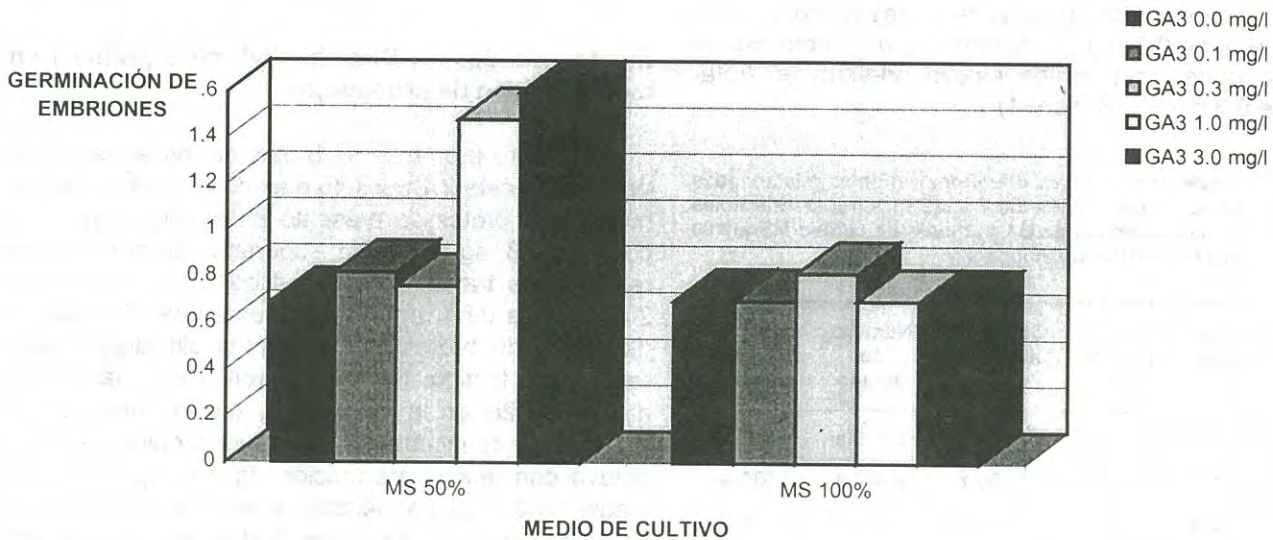
El análisis de varianza mostró que no hubo un efecto significativo de la concentración del medio de cultivo MS, pero si de la concentración con GA<sub>3</sub> y de la interacción de estos factores sobre el número de embriones germinados de Nim es significativo (Cuadro 3 y Figura 4).

**CUADRO 5.** Valores promedio del número de embriones germinados en dos concentraciones de MS y cinco niveles de GA<sub>3</sub> a los 30 días de incubación.

Número de tratamiento	Composición MS % GA <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Medias
1	50 - 0.0	0.700 b
2	50 - 0.1	0.820 ab
3	50 - 0.3	0.760 b
4	50 - 1.0	1.480 a
5	50 - 3.0	1.600 a
6	100 - 0.0	0.700 b
7	100 - 0.1	0.700 b
8	100 - 0.3	0.820 ab
9	100 - 1.0	0.700 b
10	100 - 3.0	0.700 b

α = 0.05. Medias con la misma letra vertical no presentan diferencias significativas con prueba de medias de Tukey

Se puede observar que al incrementar la concentración de GA<sub>3</sub> se incrementa la germinación de los embriones; por otro lado el GA<sub>3</sub> es más efectivo cuando se combina con un medio de cultivo MS diluido al 50 %.



**Figura 4.** Efectos de las concentraciones MS y GA<sub>3</sub> en la germinación de embriones somáticos de Nim a los 30 días de incubación.



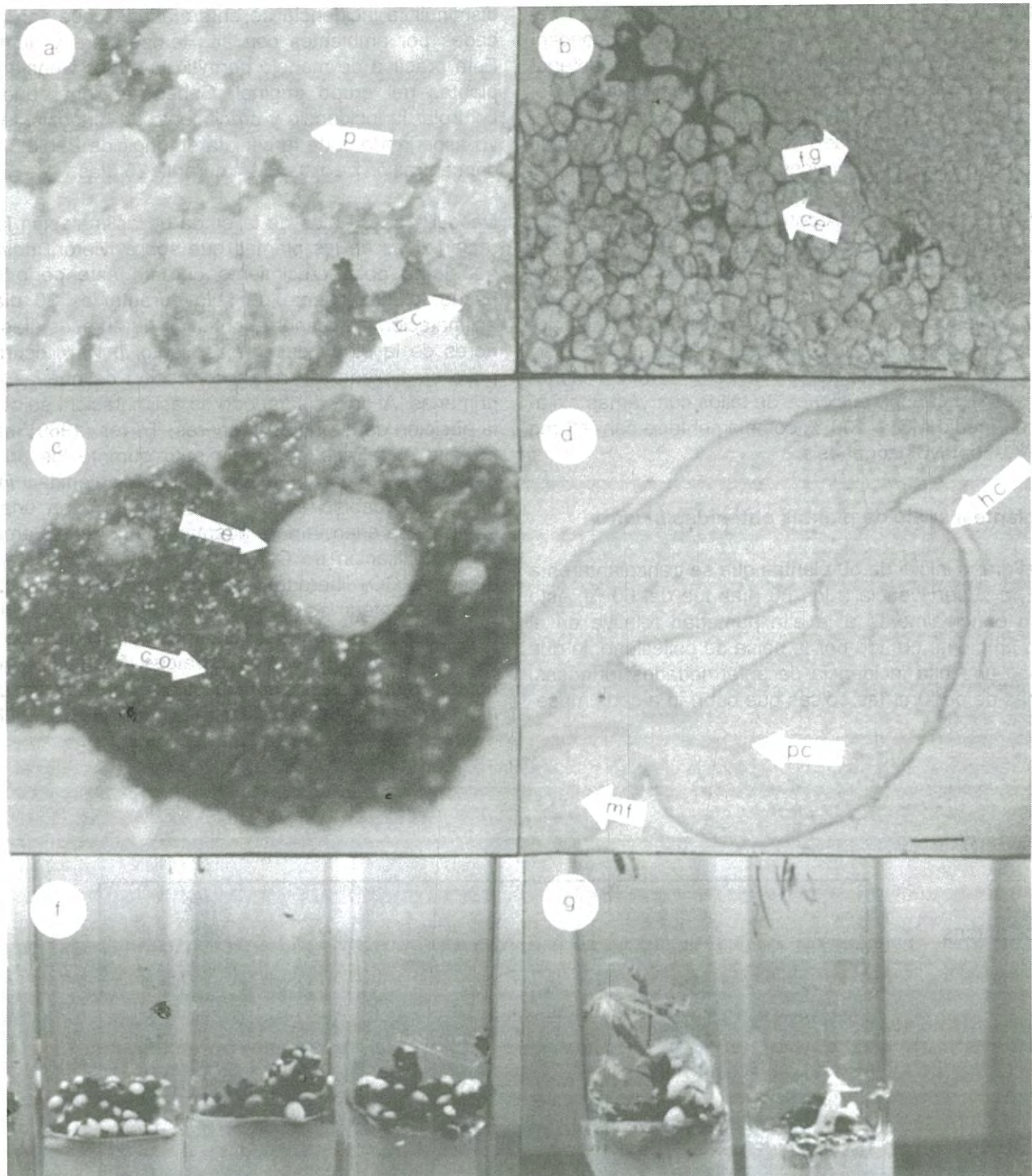


Figura 5. Embriogénesis en Nim: La barra de referencia utilizada representa 100  $\mu\text{m}$ . a) cc: células de callo friable; p: proembrión. b) ce: células embriogénicas; fg: formación globular. c) e: embrión somático; co: células de callo oxidado. d) Embrión en etapa torpeda: pc: procambium; mf: meristemo fundamental; hc: hojas cotiledonares. f) Células de callo con embriones. g) Brote y raíz de embriones. El medio de cultivo MS complementado con  $\text{GA}_3$  3.0 y 1.0 mg/l fue el que presentó mejores resultados.

## Enraizamiento de brotes

El análisis de varianza mostró que la concentración de ácido indolacético (AIA) tuvo un efecto significativo ( $P < 0.05$ ) sobre el número promedio de raíces formadas en los brotes de Nim cultivados *in vitro*, después de un periodo de incubación de 45 días. Sin embargo la concentración de BA y la interacción de los dos factores anteriores no tuvieron un efecto significativo en la variable. Como podemos observar en la Figura 5, las concentraciones de 1.0 y 3.0 mg L<sup>-1</sup> de AIA favorecieron el desarrollo de un mayor número de raíces, manifestándose como el mejor tratamiento para inducir rizogénesis el 0.1 mg L<sup>-1</sup> de BA y 3.0 mg L<sup>-1</sup> de AIA con una media de 2.38 raíces por explante. Como podemos observar, al aumentar la cantidad de AIA se incrementa la respuesta de rizogénesis. Esto coincide con el trabajo de Shrikhande *et al.* (1993), quienes encontraron que al utilizar combinaciones de AIA desde 0.5 a 5.0 mg L<sup>-1</sup> se induce un gran número de raíces en explantes de Nim. También Mohamed (1994), usando secciones de tallos con yemas axilares y un medio MS al 100 % complementado con 9.8 mg L<sup>-1</sup> de AIA obtuvo rizogénesis.

## Trasplante a suelo de plantas obtenidas *in vitro*

Del grupo inicial de 50 plantas que se transplantaron a suelo, la supervivencia a los 50 días fue del 60 %; esto debido principalmente a la alta humedad relativa en el medio ambiente creado por la bolsa de polietileno, lo que provocó una alta incidencia de enfermedades fungosas. Además de perforar las bolsas que cubrían a cada mace-

ta, para reducir la incidencia de enfermedades fue necesario descubrir por completo las macetas diariamente por lapsos de una hora aproximadamente, como forma de ventilación, cubriéndola posteriormente. La ventilación es una práctica común en invernaderos que se realiza para disminuir la incidencia de enfermedades que son provocadas por ambientes con alta temperatura y humedad. Esta práctica de manejo permitió la supervivencia de 30 plantas del grupo original. Cabe mencionar que para controlar la incidencia y crecimiento de hongos se estuvo asperjando cada tercer día el fungicida Benlate a una concentración de 1.0 mg L<sup>-1</sup> durante 25 días.

Después de 30 días de la etapa de aclimatación las características de las plantas que sobrevivieron mostraron que hubo poco crecimiento durante este periodo. De hecho, el crecimiento de tallo durante los 30 días de aclimatación fue menor al obtenido durante los días anteriores de la etapa de enraizamiento *in vitro*, ocurriendo poco crecimiento de raíz y formación de nuevas raíces primarias. Al final del periodo de aclimatación, se observó la abscisión de las hojas inferiores. Torres (1989) menciona que el retraso en crecimiento durante los primeros días de aclimatación de las plantas obtenidas *in vitro* puede ser debido a que estas plantas usan una gran cantidad de energía para adaptarse a un nuevo ambiente y que la fijación de CO<sub>2</sub> a través de la fotosíntesis es menor al CO<sub>2</sub> liberado. Además esto puede ser debido que al transferir las plantas a condiciones naturales sea difícil inducir un buen funcionamiento radicular, que tiende a ser sustituido por nuevas raíces. Además de que las hojas tienen menos cera cuticular y no hay un control efectivo de apertura y cierre de estomas (Torres, 1989).

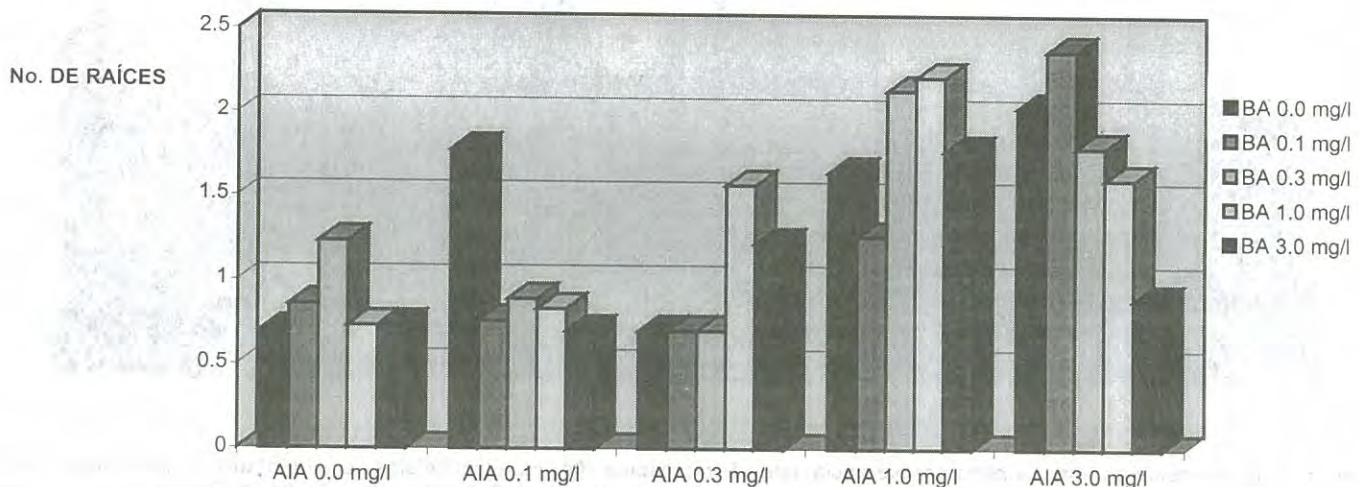
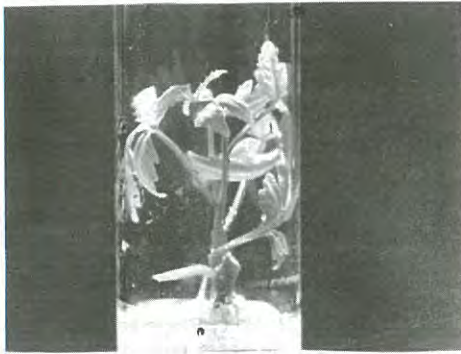


Figura 5. Efecto de cinco niveles de BA y cinco niveles de AIA sobre el número de raíces en brotes en Nim cultivados *in vitro* durante 45 días de incubación.

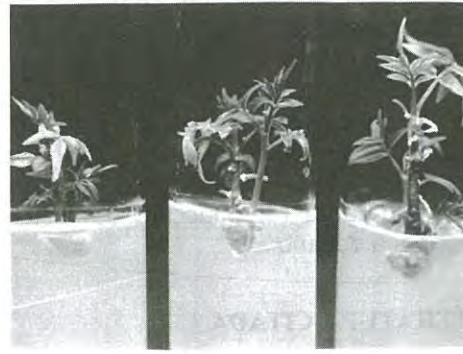
## METODOLOGÍA PARA EL CULTIVO *in vitro* DEL ÁRBOL DEL NIM

Basándose en los resultados de las diferentes etapas del estudio efectuado, la propagación *in vitro* del árbol del Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) usando microestacas se puede obtener de la siguiente manera (Figura 6):

1. Los explantes se toman de las ramas de los árboles jóvenes en cualquier fecha de año; después de cortados los explantes se colocan en agua jabonosa ( $4\text{g L}^{-1}$ ) durante el traslado al laboratorio.
2. Los explantes deben desinfectarse lavándose con jabón y agua corriente y se ponen en agitación en un recipiente con gotas de Tween-20 durante 30 minutos. Posteriormente se desinfectan con hipoclorito de sodio al 15 % por 10 minutos y en alcohol al 10 % durante 2 minutos y finalmente se enjuagan con agua destilada por 5 a 6 minutos y se transfieren a cajas de petri esterilizadas para la siembra.
3. Para multiplicar los explantes se siembran en un medio que consiste en: MS al 100 % adicionando BA al  $0.3\text{ mg L}^{-1}$ . La multiplicación celular en la base del explante se observa a las dos semanas de incubación.
4. Para inducir la rizogénesis los brotes se transfieren a un medio que contenga la siguiente composición química: MS al 100 %,  $0.1\text{ mg L}^{-1}$  de BA y  $3.0\text{ mg L}^{-1}$  de AIA. La aparición de raíces se presenta a los 10 días de incubación, teniéndose plantas completas a los 30 días de sembrado el explante. Durante el periodo de incubación se mantuvo un fotoperiodo de 16/8 horas, con una intensidad luminosa de 2700 a 3200 lux y una temperatura de  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
5. Se transfieren las plantas *in vitro* a condiciones de invernadero controlándose principalmente la humedad relativa. Se recomienda asperjar con un fungicida la planta y el sustrato desde el primer día de trasplante. En esta última etapa la planta permanece aproximadamente 30 días en invernadero.
6. Se obtiene la regeneración de plantas a las 14 semanas, desde que se establece el cultivo aséptico hasta la salida de la planta del invernadero.



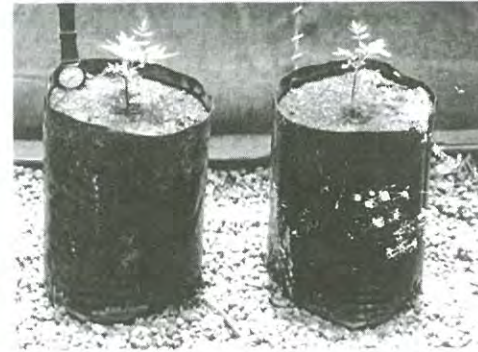
a) Establecimiento aséptico del explante



b) Multiplicación de propágulos por medio de secciones de tallo



c) Enraizamiento de los explantes



d) Acimatación de plantas en invernadero

Figura 6. Etapas del cultivo *in vitro* de *Azadirachta indica* A. Juss.: a) Establecimiento del cultivo aséptico del explante y desarrollo de la yema axilar. b) Multiplicación de propágulos. c) Enraizamiento y desarrollo de los explantes. d) Aclimatación de plantas *in vitro* en invernadero.

## CONCLUSIONES

Se logró establecer una metodología adecuada para el cultivo del árbol del Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) *in vitro*, obteniéndose plantas en 14 semanas aproximadamente desde la siembra del explante hasta la obtención de planta aclimatada al medio ambiente.

La multiplicación de brotes se puede llevar a cabo en presencia de  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$  y  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  de BA. También se puede obtener embriogénesis somática del Nim con una respuesta muy favorable debido al efecto de  $\text{GA}_3$  en células de callo.

Para obtener rizogénesis es necesario complementar el medio de cultivo con BA al  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  y  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA.

Para la aclimatación de las plantas se observó que es de suma importancia mantener la planta libre de patógenos y controlar el exceso de humedad por medio de períodos cortos de ventilación, por lo menos durante la primera semana de aclimatación. Cuando las plantas obtenidas *in vitro* se transplantaron del medio de cultivo a macetas con sustrato para su aclimatación, se obtuvo un 60 % de supervivencia de plantas.

La regeneración de planta del Nim *in vitro* es por la vía de explantes de tallo, ya que por vía semilla no fue posible debido al alto índice de presencia de contaminantes especialmente bacterias. La multiplicación *in vitro* es una valiosa alternativa para la reproducción de dicha especie en cualquier época del año.

## LITERATURA CITADA

- AHMED, S. y GRAINGE, M. 1985. The use of indigenous plant resources in rural development. *International Journal for Development Technology* 3: 123-130.
- AHMED, S. y GRAINGE, M. 1986. Potential of the Nim tree development. *Economic Botany*. 40(2): 201-209.
- BENGE, M. D. 1988. Cultivation and propagation of the Neem Tree. *In: Focus on Phytochemical Pesticides*. Vol. 1: The Neem Tree. Martín Jacobson De. C. R. C. Press Inc. Boca Ratón, Florida. 178 p.
- CRUZ, D. 1993. Nim: Programa para promover el desarrollo rural en Venezuela. Cooperativa Mixta El Buchal, Dabajuro, Estado de Falcon, Venezuela. 11 p.
- DEL REAL, S. J.; REYES, C. H.; CASTRO, P. A.; GRACIA, G.; GONZÁLEZ, M.A. 1995. Conozcamos el árbol del Nim. ECOSTA. México. Mimeografiado. 15 p.
- GEILFUS, F. 1989. El árbol al servicio del agricultor. Guía de especies. CATIE (Costa Rica). pp: 603-605.
- GROSSMAN, J. 1995. Neem as an alternative fumigant (Conference Notes). IPM practitioner. Monitoring the Field of pest Management. Kenya. Vol XVII: 4.
- JACOBSON, M. 1989. Phytochemical pesticides Vol.1: The Neem tree. CRC. Press. Inc. Florida, Boca Raton. 178 p.
- JOHNSON, L.P. 1993. The Neem tree: Green resource for a sustainable 21st. Century. *Wildlife & Environment*. 2 (1):22-23.
- KESHAVA, B. 1991. El árbol del Nim, Diversidad de usos. *Perfiles liberales (Venezuela)*. 24: 59-60.
- MOHAMED, Y.Y. 1994. Shoot proliferation and plant formation from Neem (*Azadirachta indica* Juss) with thidiazuron. *Hortscience* 29(5):515.
- NATIONAL ACADEMY PRESS. 1993. Nim: A tree for solving global problems. Report of an Ad Hoc Panel of the board on science and technology for international development. National Research Council, Washington. D.C. 107 p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC).1992. Neem: A tree for solving global problems. National Academy Press, Washington, D.C. 141 p.)
- PIMENTEL, B., L. 1996. Viveros forestales. Mimeografiado. UACH. Chapingo, México. s/p.
- RODRÍGUEZ, E. 1994. El nim (*Azadirachta indica*) como especie prometedora para la sombra de ganado en Cuba. Taller internacional sobre sistemas silvopastoriles en la producción ganadera. Matanzas, Cuba. 13-15.
- SHMUTTERER, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu. Rev. Entomol.* 35:271-297
- SHRIKHANDE, M.; THENGANE, R. S. y MASCARENHAS, A. F. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Azadirachta indica* A. Juss. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 29 p: 38-42.
- TORRES, K., C. 1989. Stages of micropropagation. *In: Tissue culture techniques for horticultural crops*. New York. pp. 52-69
- VERA, A.F. 1994. Especies para leña: arbustos y árboles para producción de energía. CATIE. Turrialba, Costa Rica. pp. 84-87.