

Abanico Agroforestal. Janeiro-Dezembro 2020; 2(1):1-14. <http://dx.doi.org/10.37114/abaagrof/2020.4>

Artigo Original. Recebido: 06/12/2019. Aceito: 20/04/2020. Publicado: 25/04/2020.

Germinação *in vitro* e indução de calos e raízes em *Bursera laxiflora* S. Watson

In vitro germination and induction of callus and root in *Bursera laxiflora* S. Watson

Mc-Caughey-Espinoza Diana*¹ [ID](#), Ayala-Astorga Gloria¹ [ID](#), García-Baldenegro Claudia² [ID](#), Buitimea-Cantúa Nydia³ [ID](#), Buitimea-Cantúa Génesis³ [ID](#), Ochoa-Meza Andres² [ID](#)

¹Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. México.

²Universidad Estatal de Sonora UES. Av. Ley Federal del Trabajo CP. 83100, Hermosillo Sonora. México.

³Tecnológico de Monterrey, Centro de Biotecnología-FEMSA, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Campus Monterrey. Av. Eugenio Garza Sada 2501, Monterrey, N.L., C.P. 64849, México. ⁴Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora. México. diana.mccaughey@unison.mx, gloria.ayala@unison.mx, vanessagarciab81@gmail.com, nebc@tec.mx, genesis.vidal@tec.mx y andres.ochoa@unison.mx

RESUMO

O Torote prieto (*Bursera laxiflora* S. Watson) é uma espécie endêmica, florestal e medicinal nas áreas áridas e semi-áridas do estado de Sonora. O presente estudo avaliou a germinação e indução de calos e raízes de torote prieto de plântulas cultivadas *in vitro*. 50% WPM de sais minerais, vitaminas e ácido indol butírico (AIB) foram utilizados como meio de crescimento em diferentes concentrações (0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mgL⁻¹). Ao usar 1,5 e 2,0 mgL⁻¹ de AIB, 70% de germinação foi apresentada. A contaminação foi de 5,0 a 27,5% e a altura das plântulas foi de 6,67 a 10,1 cm. Os calos apresentaram alturas de 2,4 a 3,64 mm na folha, 2,45 a 3,55 mm no caule e broto apical de 2,49 a 3,42 mm. A largura do calo na folha foi de 2,20 a 2,78 mm, botão apical de 2,13 a 2,22 mm e caule de 2,11 a 2,28 mm. A indução radicular ocorreu em concentrações de 0,5 a 2,0 mgL⁻¹ de AIB nos explantes de caule e folhas, exceto no botão apical. A aplicação de AIB estimula a indução de calos e raízes no torote prieto.

Palavras-chave: *Bursera laxiflora*, micropropagação, explantes, grãos e raízes.

ABSTRACT

Torote prieto (*Bursera laxiflora* S. Watson) is an endemic, forest and medicinal species of the arid and semi-arid areas of the state of Sonora. In the present study the germination and induction of callus and root of torote prieto was evaluated from *in vitro* cultivated seedlings used as a medium of WPM growth in half of mineral salts, vitamins and indolbutyric acid (AIB) at different concentrations (0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mgL⁻¹). When using 1.5 and 2.0 mgL⁻¹ of AIB, 70% germination occurred. The contamination was 5.0 to 27.5% and the height of the seedlings was 6.67 to 10.1 cm. The calluses presented heights of 2.4 to 3.64 mm in leaf, 2.45 to 3.55 mm in stem and in apical bud of 2.49 to 3.42 mm. The width of the calluses in leaf was of 2.20 to 2.78 mm, apical bud 2.13 to 2.22 mm and stem 2.11 to 2.28 mm. Root induction occurred in concentrations of 0.5 to 2.0 mgL⁻¹ of AIB in stem and leaf explants except in apical bud. The application of AIB stimulates the induction of callus and root in torote Prieto.

Keywords: *Bursera laxiflora*, micropropagation, explants, calluses and root.

INTRODUÇÃO

A crio-conservação e regeneração de plantas *in vitro* é utilizada para conservar e micropropilar material vegetal específico, a fim de realizar a conservação *ex situ* e permitir o desenvolvimento de florestas clonais ou de micropropagação (Martínez *et al.*, 2003). Essas técnicas oferecem uma série de vantagens, como a possibilidade de produzir um número elevado de plantas homogêneas e de qualidade fitossanitária muito alta, em menor período de tempo e em espaços reduzidos (Sharry *et al.*, 2015).

A cultura *in vitro* constitui uma rota de propagação com resultados satisfatórios nos coeficientes de multiplicação e devido às possibilidades de sucesso das plantações florestais. Os principais avanços na cultura de tecidos *in vitro* permitiram a multiplicação de espécies de interesse, por meio da organogênese e embriogênese somática (Daquinta *et al.*, 2000; Barbón *et al.*, 2011).

Plantas de madeira e não-madeireiras representam um recurso genético florestal de importância socioeconômica, agroflorestal e científica (medicinal). Os recursos genéticos florestais são essenciais para manter os diferentes ecossistemas presentes; no entanto, estão sujeitos a pressões graduais de mudança climática e uso insustentável (Yanchuk, 2002).

O gênero *Bursera Jacquin* ex L. (Burseraceae) é diversificado em diferentes regiões do México e possui 82 táxons registrados (Rzedowski *et al.*, 2005). O torote prieto possui propriedades medicinais, aliadas aos benefícios que essa espécie traz para os ecossistemas naturais, que são continuamente explorados, implicando a baixa população e a regeneração dessa espécie em seu habitat natural. No entanto, existem poucos trabalhos relacionados à propagação *in vitro* de espécies florestais no noroeste do México, o que constitui um problema para a conservação dos recursos genéticos florestais. Portanto, é possível criar mecanismos viáveis para compensar os problemas de propagação de espécies de interesse florestal, utilizando a biotecnologia em tecidos vegetais que permitam clonar espécies sem alterar o ambiente natural do habitat das espécies; obtenção de plantas livres de patógenos e em menor tempo (Rebolledo-Camacho *et al.*, 2006; Delgado *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, o uso da biotecnologia na propagação *in vitro* de espécies florestais aumentou gradualmente; entretanto, não há estudos relacionados à obtenção de plantas *in vitro* de torote prieto a partir de plântulas estéreis.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação e indução de calos e raízes de torote prieto de plântulas cultivadas *in vitro*, usadas como meio de crescimento *Woody Plant Medium* (WPM/50) na metade da concentração de sais minerais, vitaminas e ácido indolbutírico em diferentes concentrações.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada no laboratório de cultura de tecidos do Departamento de Pesquisa Científica e Tecnológica da Universidade de Sonora (DICTUS).

Local de coleta

O material vegetal foi coletado no Rancho Bella Vista, localizado a 29° 10'02,83" de latitude norte e 110° 58'47,48" de longitude oeste, a 277 metros acima do nível do mar; com uma precipitação média anual de 330 mm e temperatura média de 24°C ([SAGARPA, 2010](#)) Sementes maduras foram coletadas de plantas vigorosas de torote prieto (*Bursera Laxiflora*), no mês de setembro de 2019.

Preparação do meio de cultura

Woody Plant Medium (WPM/50) (Trigiano e Gray, 2011) foi utilizado como meio de cultura. Este meio foi utilizado com metade da sua concentração de sais, consistindo de sacarose, ágar e vitaminas, como tiamina e mio-inositol. O fitohormônio utilizado foi ácido indolbutírico em diferentes concentrações (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mgL⁻¹), o pH foi ajustado para 5,7 com NaOH, na concentração de 0,1 N. A câmara de fluxo laminar foi esterilizada com álcool etílico a 99%. Foram utilizados 25 ml de meio WPM por frasco de vidro, tipo gerber. Finalmente, a esterilização foi realizada no autoclave modelo esterilmático, a uma temperatura de 120 °C e com uma pressão de 15/cm² por 15 minutos.

A germinação da semente

As sementes foram desinfetadas com álcool etílico (70%) por 3 minutos e hipoclorito de sódio (NaClO) (CLOROX® 15% de cloro ativo) por 12 minutos e adição duma gota de Tween 20. Aplicando 3 lavagens com água deionizada, e posteriormente colocá-los em uma mistura de ácido cítrico e ascórbico por 5 minutos, para semear no meio de cultura WPM (Trigiano e Gray, 2011).

Obtenção de explantes

Após a germinação, foram obtidas plântulas que apresentavam todas as características morfológicas da planta silvestre. Essas plantas foram subcultivadas com explantes (broto apical, caule e folhas), utilizando 50% do meio WPM, adicionado ao AIB. Para a semeadura dos explantes obtidos das plântulas, estes foram passados para a câmara de fluxo laminar (marca Edge Gard Hood). Foram utilizadas placas de Petri, bisturi e pinça previamente esterilizados. Os cortes e obtenção do segmento foliar, brotos apicais e caule (explantes) não precisaram ser desinfetados, sendo um material asséptico.

Condição de colheita

A cultura foi mantida na sala de crescimento sob condições controladas, a uma temperatura de 25 °C, com um período fotográfico de 16 horas de luz; apresentando intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ e 8 horas de escuridão, com temperatura de 25 \pm 2 °C.

Variáveis a avaliar

A avaliação foi realizada por observação direta, a partir do terceiro dia após o plantio dos explantes, para posterior realização das avaliações a cada sétimo dia. A avaliação foi realizada até 30 dias após a semeadura. As variáveis avaliadas foram: porcentagem de germinação (%), altura de plântulas (cm), porcentagem de contaminação (%), altura de calos (%), largura de calos (cm) e número de raízes. Segundo o [ISTA \(2019\)](#), foi realizada a porcentagem de germinação. Para as medições de calos presentes nos explantes, foi utilizado um modelo Mitutoyo Absolute CD-6CSX, número de série 06401649 6".

Análise estatística

O desenho experimental foi o inteiramente casualizado e o fatorial 5x3, com 10 repetições. Foi realizada análise de variância (ANDEVA), com nível de significância de $P < 0,05$, e comparação de médias por Tukey. Para análise dos dados, foi utilizado o pacote estatístico JMP versão 9.0.1 (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação *in vitro* das sementes de torote prieto (*Bursera laxiflora*) teve início no nono dia e concluiu sua avaliação 21 dias após a semeadura. Não houve diferenças significativas ($P \geq 0,05$) ao usar as concentrações de 2, 1,5, 1,0 e 0,5 mgL^{-1} de AIB, mostrando 45 a 70% de germinação; exceto o controle (sem tratamento), com 30% de germinação no meio de cultura utilizado (WPM/50) em diferentes concentrações de AIB (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mgL^{-1}). Não houve diferenças significativas ($P \geq 0,05$) na porcentagem de sementes não germinadas, mostrando 22,5 a 42,5%.

É importante notar que neste estudo não houve plântulas anormais, portanto, não existem diferenças significativas, ver figura 1 e tabela 1 [Kameswara et al., \(2007\)](#). Enfatiza que a germinação determina o crescimento do embrião, a protrusão do radículo e testa.

Em relação a este estudo, as plântulas foram consideradas com crescimento normal, pois apresentavam raízes, brotações e órgãos importantes para o seu desenvolvimento. Ao apresentar esses órgãos, as plântulas apresentam deficiências que afetarão a qualidade das mesmas ([AOSA, 2005](#)).



Figura 1. Germinação *in vitro* de *Bursera laxiflora* S. Watson

A porcentagem de germinação obtida neste estudo para as sementes de torote prieto é muito favorável, pois essa espécie arbórea é muito importante para o estado de SonoraM; no entanto, os resultados da porcentagem de germinação obtidos neste estudo não coincidem com os obtidos por ((Pinta *et al.*, 2017), que utilizaram o meio de cultura MS ((Murashige y Skoog (1962); esses pesquisadores relataram 11,11% de germinação *Bursera graveolens* (KUNTH), com tratamento de escarificação mecânica e 0,5 mg/L de ácido giberélico (AG3).

Resultados semelhantes foram relatados por (Bonfil-Sanders *et al.*, 2008), que obtiveram de 30 a 60% de germinação *in situ* em sementes de *Bursera bicolor*, *Bursera copallifera* e *Bursera glabrifolia*, armazenadas por seis meses em refrigeração a 5 °C. Portanto, os resultados mostram que a propagação de algumas espécies de *Bruceras*, incluindo *Bursera laxiflora*, apresenta dificuldades para sua germinação, uma vez que não atingem 80% dos valores de germinação.

Recentemente, Mero *et al.*, (2017) avaliaram o efeito de reguladores auxínicos de crescimento em diferentes concentrações, na regeneração de tecido vegetal em estacas de *Bursera graveolens*, obtendo formação de brotações e calos, exceto nas raízes, ao usar 800 ppm AIB 60 dias após o plantio. Infelizmente, há pouca informação na literatura sobre a germinação de *Burseras*; os relatórios mostram resultados com baixa porcentagem de germinação (Andrés-Hernández y Espinosa-Organista, 2002). Da mesma forma (Ray y Brown, 1995; Ortiz-Pulido y Rico-Gray, 2006), relataram porcentagens de germinação em condições naturais, inferiores às obtidas em nível laboratorial.

Devido à dificuldade descrita anteriormente pela madeira para sua propagação na forma natural e/ou artificial, as técnicas de cultura de tecidos *in vitro* permitem novas técnicas para a propagação de culturas de crescimento lento e a criopreservação de tecidos (Engelmann, 2000; Dixit *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). A baixa porcentagem de germinação das sementes dessa espécie se deve ao fato de não estarem em condições de germinar rapidamente, após serem colhidas; as sementes precisam de um período de descanso, de natureza transitória, de aproximadamente seis meses (Morillo *et al.*, 2017).

Tabela 1. Germinação *in vitro*, contaminação e altura de plântulas de sementes de torote prieto (*Bursera laxiflora* S. Watson)

Tratamento AIB mgL ⁻¹	Sementes germinadas (%)	Sem sementes Brotos (%)	Contaminação (%)	Altura das plântulas (cm)
0	30.0±24.49 ^b	42.5±17.07 ^a	27.5±22.17 ^a	6.67±4.45 ^a
0.5	45.0±12.90 ^a	32.5±22.17 ^a	22.5±12.58 ^a	9.05±0.61 ^a
1.0	67.5±9.57 ^a	22.5±9.57 ^a	10.0±0.00 ^a	10.01±0.14 ^a
1.5	70.0±8.16 ^a	22.5±5.00 ^a	7.5±5.00 ^a	10.01±0.25 ^a
2.0	70.0±8.16 ^a	25.0±5.77 ^a	5.0±5.77 ^a	10.21±0.24 ^a

Médias com letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas ($P < 0,05$). Os dados apresentados são a média de 10 repetições com 3 amostras cada frasco por tratamento.

Altura das plântulas

Não houve diferenças significativas ($P \geq 0,05$) na variável altura de plântulas, em relação às concentrações manejadas neste trabalho, mostrando alturas de 6,67 a 10,21 cm, respectivamente. As plântulas de torote prieto (*Bursera laxiflora*) apresentaram bom crescimento e desenvolvimento adequado. Nenhuma pesquisa publicada avaliando a micropropagação *in vitro* de *Burseras* foi encontrada, consulte a Tabela 1 e a Figura 2.

Contaminação

A contaminação das sementes foi de 5 a 27,5%, causada principalmente por fungos e bactérias ambientais. Eles não apresentaram diferenças significativas ($P \geq 0,05$) nessa variável ao usar as diferentes concentrações de WPM/50, ver tabela 1. A contaminação das sementes desta investigação é menor do que a obtida por [Pinta et al., \(2017\)](#)., que relataram até 93% de contaminação *in vitro* em explantes de *Bursera graveolens* (Kunth).

As culturas *in vitro* em geral têm duas características fundamentais: assepsia (ausência de microrganismos contaminantes de fungos e bactérias) e controle de fatores que perturbam o crescimento, como as condições ambientais da cultura. Portanto, é necessária uma detecção correta dessas fontes e o tipo de microrganismo deve ser identificado. Esses são aspectos importantes para o sucesso das culturas e para impedir que a contaminação primária nas culturas *in vitro* provenha da planta doadora ([George et al., 2008](#); [Levitus et al., 2010](#); [Sharry et al., 2015](#)).



Figura 2. Obtenção de explantes, caules com calos e brotações

Para minimizar o problema de contaminação, desinfetantes e/ou misturas de fungicidas e bactericidas têm sido aplicados a explantes (Das *et al.*, 2010; Jayakrishna *et al.*, 2011). Da mesma forma, Pérez-Alonso *et al.*, (2015) mencionam a importância de coletar material vegetal de acordo com a época do ano, influência das temperaturas, precipitação e altas taxas de contaminação; o que fosse vital para a redução da contaminação.

Calo e raiz em *Bursera laxiflora*

A porcentagem de calos presentes nos explantes de acordo com os tratamentos utilizados com AIB, mostrou diferenças significativas em relação ao tratamento zero (controle), sem mgL^{-1} de AIB. A maior formação média de calos foi apresentada no tratamento com AIB de $1,5 \text{ mgL}^{-1}$, nos três explantes (folha, broto apical e caule), obtendo 80% dos calos, seguido pelo tratamento $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ de AIB, com calo de 78%, $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de AIB, com 77%; e finalmente o $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de AIB, com 7,2%. O uso de AIB estimula positivamente o crescimento de calos após 30 dias.

A tabela 2 mostra a indução de calos presentes nas folhas, broto apical e caule em diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB). Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) foram apresentadas em relação à altura e largura do calo. Na concentração de $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ de AIB, os maiores valores de altura foram apresentados na folha de 3,64 mm e no caule de 3,55 mm.

No entanto, não houve diferenças significativas ($P \geq 0,05$) nos valores de gema apical nas concentrações de $1,5$ e $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ de AIB com 3,42 e 2,72 mm, respectivamente. Um comportamento semelhante na altura do calo foi observado na largura do calo nos explantes. Na concentração de $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ de AIB, maiores larguras de folha (2,78 mm) e caule (2,68 mm) foram apresentadas. No broto apical não houve diferenças significativas nas concentrações de $0,5$ e $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ de AIB com 2,21 mm e 2,22 mm, respectivamente.

Tabela 2 Indução de calos em explantes de torote prieto (*Bursera laxiflora* S. Watson)

Tratamento AIB mgL ⁻¹	Altura do calo (mm)			Largura do calo (mm)		
	Folha	Caule	Broto apical	Folha	Caule	Broto apical
0	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
0.5	2.40±0.08 ^c	2.45±0.16 ^c	2.49±0.19 ^b	2.20±0.08 ^c	2.11±0.60 ^b	2.13±0.03 ^b
1.0	2.69±0.14 ^{bc}	2.62±0.12 ^c	2.73±0.26 ^b	2.36±0.08 ^{bc}	2.13±0.04 ^b	2.13±0.04 ^b
1.5	3.09±0.23 ^b	3.06±0.17 ^b	3.42±0.49 ^a	2.53±0.08 ^{ab}	2.27±0.03 ^a	2.21±0.01 ^a
2.0	3.64±0.31 ^a	3.55±0.21 ^a	2.72±0.19 ^a	2.78±0.24 ^a	2.28±0.02 ^a	2.22±0.01 ^a

Médias com letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas ($P < 0,05$). Os dados apresentados são a média de 10 repetições com 3 amostras cada frasco por tratamento.

É importante ressaltar que em baixas concentrações de AIB (0,5 e 1,0 mgL⁻¹), no broto apical, foram induzidos calos com menor altura e largura. O caule também apresentou diferenças significativas ($P \geq 0,05$), em relação às concentrações avaliadas; sendo melhor a dose de 2,0 1,0 mgL⁻¹, nas duas medidas (altura e largura do calo), ver tabela 2 e figura 3. Quanto ao controle (sem AIB), não houve altura e largura do calo; Isso indica que os explantes de *Bursera laxiflora* (folha, broto apical e caule) requerem um fito-hormônio que estimula a indução de calogênese. Os calos obtidos independentemente da concentração e explante deste estudo apresentaram consistência firme e cor branca cremosa, passando a verde claro.

De acordo com a presença do número de raízes nos explantes (folha, broto apical e caule) de *Bursera laxiflora*, houve diferenças significativas ($P \leq 0,05$) no caule, na concentração de 2,0 mgL⁻¹ de AIB (2,7 cm) Na concentração de 0,5 mgL⁻¹ de AIB, os menores valores de caule e folha foram apresentados (1,00 e 0,25 cm), respectivamente. Em relação ao botão apical, as raízes não apareceram em concentrações mais baixas (0,5 e 1,0 mgL⁻¹ de AIB). Nos explantes sem AIB (controle), não houve crescimento radicular nos diferentes explantes do caule, folhas e brotos apicais, ver Tabela 3 e Figura 3.

Tabela 3. Indução de raízes em explantes de torote prieto (*Bursera laxiflora* S. Watson)

Tratamento mgL ⁻¹ AIB	Tipo de explante (cm)		
	Folha	Caule	Broto apical
0	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
0.5	1.00±0.81 ^b	0.25±0.50 ^a	0.00±0.00 ^a
1.0	1.75±0.50 ^{ab}	0.50±0.57 ^a	0.00±0.00 ^a
1.5	1.25±0.57 ^a	0.50±0.57 ^a	0.25±0.50 ^a
2.0	2.7±0.50 ^a	0.50±0.57 ^a	0.25±0.50 ^a

Médias com letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas ($P < 0,05$). Os dados apresentados são a média de 10 repetições com 3 amostras cada frasco por tratamento.

Os explantes avaliados neste experimento não apresentaram embriogênese direta; no entanto, eles produziram tecido caloso sem o tecido embriogênico, desenvolvendo

gradualmente mais massa pró-embriogênica ao longo do tempo de incubação. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por [Kryvenki et al., \(2008\)](#), que obtiveram calos em todos os tratamentos, utilizando o semi-sólido Murashige e Skoog (MS) em *Stevia rebaudiana* Bert como meio de cultura, exceto no controle (sem cultura).



Figura 3. Calo e raiz no caule

Em relação à porcentagem de calos presentes nos explantes utilizados neste trabalho (broto apical, caule e folha), foram superiores aos obtidos por [Rodríguez et al., \(2014\)](#), utilizaram Murashige e Skoog (MS) como meio de cultura, suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA), em explantes de hipocótilo (62, 62, 74 e 64%).

Segundo [Smith \(2012\)](#), o tipo de calo presente é um importante indicador do caminho morfogênico a seguir, independentemente da cor do calo; estes indicam que os calos organogênicos provêm de calos nodulares de cor verde ou aparência oxidada, como fenólicos ([Bandyopadhyay et al., 1999](#); [Ainsley et al., 2000](#)). A mudança na aparência dos grãos à medida que são cultivados ao longo do tempo foi relatada por [Larson et al., \(2006\)](#). Nesse sentido, [Shiram et al., \(2008\)](#) apontam que altas concentrações de auxina ou citocinina estimulam a produção de calos e que sua aparência está relacionada ao tipo de hormônio utilizado durante sua indução.

Várias investigações relataram que auxinas/citocinina favorecem a indução de calos em *Pinus strobus* L., bem como em híbridos de *Eucalyptus granáis* e *Eucalyptus urophylla* ou apenas auxinas originando calos caulogênicos ([Tang y Newton, 2005](#); [Hajari et al., 2006](#)). Em outros casos, como em *Eucalyptus nitens*, *E. globulus* e *E. camaldulensis*, a indução por auxinas gerou calos embriogênicos ([Bandyopadhyay et al., 1999](#); [Gopalakrishnan et al., 2010](#)).

CONCLUSÕES

A germinação *in vitro* da semente de torote prieto (*Bursera laxiflora* S. Watson) pode ser promovida com a aplicação de ácido indolburúrico (AIB), em concentrações de 1,5 ou 2,0 mgL⁻¹; usando meio de cultura WPM/50. As plantas germinadas *in vitro* produziram brotos e raízes, apresentando características morfológicas da planta selvagem. O uso do ácido indole burocrático nas concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0 mgL⁻¹ promove a formação de

calogênese confiável, de cor branca, passando para verde claro e organogênese em explantes de torote prieto (*Bursera laxiflora* S. Watson). Esses resultados indicam que é possível estimular o desenvolvimento de calos e raízes para a conservação do torote prieto (*Bursera laxiflora* S. Watson), por ser uma espécie endêmica no estado de Sonora.

AGRADECIMENTO

A Yeimi C. Mc Caughey Espinoza, por seu grande apoio na coleta de sementes, pela realização deste trabalho de pesquisa.

LITERATURA CITADA

AINSLEY P, Collins G, Sedgley M. 2000. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 36: 470-474. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0084-5>
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-000-0084-5>

ANDRÉS-HERNÁNDEZ A, Espinoza-Organista D. 2002 Morfología de plántulas de *Bursera* Jacq ex L. (Burseraceae) y sus implicaciones filogenéticas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 70:5-12. ISSN: 0366-2128. <https://doi.org/10.17129/botsci.1652>

AOSA. Association of Official Seed Analysts. 2005. Rules for testing seeds. Association of Official Seed Analysts, USA. <https://www.analyzeseeds.com/about-us/>

BANDYOPADHYAY S, Karen C, Gillian R, John D. 1999. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. *Plant Science*. 140: 189-198. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00221-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00221-0)

BARBÓN R, Borroto I, Pérez MOL. 2011. Embriogénesis somática de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. En medios de cultivo semisólidos. *Revista Forestal Baracoa*. AGRIS: International Information System for the Agricultural Science and Technology ISSN: 0138-6441. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CU2011800203>

BONFIL-SANDERS C, Cajero-Lázaro I, Evans RY. 2008. Germinación de semillas de seis especies de *Bursera* del centro de México. *Agrociencia*. 42(7):827-834. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000700009&lng=es&tlng=es.

DAQUINTA GM, Ramos L, Lezcano Y, Rodríguez R, Escalona M. 2000. Algunos elementos en la micropropagación de la Teca. *Rev. Biotecnología Vegetal*. 1: 39-44. ISSN: 1609-1841. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20023071989>

DAS AP, Mukherjee TB. 2010. High frequency micropropagation of *Aloe vera* L. Burm. F. as a low cost option towards commercialization. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 20 (1): 29-35. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v20i1.5962>

DELGADO MF, Cuba M, Hechenleitner P, Thiers O. 2008. Propagación vegetativa de taique (*Desfontainia spinosá*) y tepa (*Laureliopsis philippiana*) con fines ornamentales. *Bosque (Valdivia).* 29(2):120-126. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-92002008000200004

DIXIT S, Ahuja S, Narula A, Srivastava P. 2004. Cryopreservation: A Potential Tool for Long-term Conservation of Medicinal Plants. p. 278 – 288. In: Srivastava P, Narula A, Srivastava S. (eds) *Plant Biotechnology and Molecular Markers*. Springer, Dordrecht. ISBN 978-1-4020-1911-1. https://doi.org/10.1007/1-4020-3213-7_19

ENGELMANN F. 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm: Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), Tsukuba. (Japan); International Plant Genetic Resources Instit., (IPGRI), Rome (Italy). Pp. 8-15. ISBN 92-9043-428-7

GEORGE EFA, Hall M, Geert-George De Klerk. 2008. Plant Tissue Culture Procedure-Background. En: George EF, Hall MA, de Klerk GJ (Eds) *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd. Edition. Vol 1. The Background*. Pp. 1-28. Springer. Dordrecht.

GOPALAKRISHNAN Nair, Prakash Gurumurthi K. 2010. Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 13–20. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9611-1>.

HAJARI E, Watt M, Mycock D, McAlister B. 2006. Plant regeneration from induced callus of improved *Eucalyptus* clones. *South African Journal of Botany.* 72: 195 - 201. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2005.07.003>

ISTA [International Seed Testing Association]. 2019. *International Rules for Seed Testing*. Zurich, Switzerland: Seed Science & Technology. ISBN: 3906549275

JAYAKRISHNA C, Karthik C, Barathi S, Kamalanathan D, ArulSelvi P. 2011. *In vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Miller, a miracle herb. *Research in Plant Biology.* 1(5): 22-26. ISSN: 2231-5101. https://www.academia.edu/5078372/In_vitro_propagation_of_Aloe_barbadensis_Miller_a_miracle_herb

KAMESWARA Rao N, Hanson J, Ehsan Dulloo M, Ghosh K, Novell D, Larinde M. 2007. "Manual para el Manejo de Semillas en Bancos de Germoplasma". *Manuales para Bancos de Germoplasma N° 8*. Bioversity International, Roma, Italia.

https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Manual_para_el_manejo_de_semillas_en_bancos_de_germoplasma_1261_01.pdf

KRYVENKI M, Kosky RG, Guerrero D, Dominguez M, Reyes M. 2008. Obtención de callos con estructuras embriogénicas de *Stevia rebaudiana* Bert. en medios de cultivo semisólido. *Biotecnología Vegetal*. 8(2): 91-98. ISSN 2074-8647. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/341/html>

LARSON CG, Gómez C, Sánchez-Olate M, Ríos D. 2006. Inducción de caulogénesis indirecta en *Eucalyptus globulus*. *Bosque (Valdivia)*. 27(3):250-257. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002006000300004>

LEVITUS G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. 258 http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010/09/bio_WEB.pdf

MARTÍNEZ R, Azpiroz HS, Rodríguez J, Cetina VM, Gutiérrez MA. 2003. Aplicación de la biotecnología en los recursos genéticos forestales. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 9(1):17-34. ISSN 2007-3828. <https://www.redalyc.org/pdf/629/62990103.pdf>

MERO Jalca Otto F, Cuásquer Fuel E, García Lucas LM, Ramos Rodríguez MP, Jiménez González A. 2017. Efecto de reguladores de crecimiento tipo auxínico para la regeneración de tejido vegetal en *Bursera graveolens*. *Revista Cubana de Ciencias Forestales*. 5(3):259-269. ISSN: 1996-2452 RNPS: 2148. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=62220>

MORILLO Infante Luis F, Eras Guamán Víctor H, Moreno Serrano J, Minchala Patiño J, Muñoz Chamba L, Yaguana Arévalo M, Angamarca Ruth P, Valarezo Ortega Cristian, Sinche Freire M. 2017. Estudio Fenológico y Propagación de *Bursera graveolens* (Kunth) en la Comunidad de Malvas, Cantón Zapotillo, Provincia de Loja. *Rev. Bosques latitud Cero*. 6(2):10-14: ISSN 2528-7818. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/222>

MURASHIGE T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 15: 473-497. http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/03_Murashige%20Skoog1962.pdf

ORTIZ-PULIDO R, Rico-Gray V. 2006. Seed dispersal of *Bursera fagaroides* (Burseraceae): the effect of linking environmental factors. *The Southwestern Naturalist*. 51: 11-21. <https://www.jstor.org/stable/3672707?seq=1>

PÉREZ-ALONSO Naivy, Capote Alina, Pérez Anabel, Gómez Leticia, Jiménez Elio. 2015. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de brotes de *Aloe vera* L. *Biotecnología Vegetal*. 15(2):85-95. ISSN 2074-8647. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/14/494>

PINTA Diego M, Eras-Guamán VH, González-Zaruma DU, Moreno-Serrano J, Minchala-Patiño JE, Yaguana-Arévalo M, Poma-Angamarca RA, Valarezo-Ortega CO, Sinche-Freire MG. 2017. Procesos biotecnológicos para la proliferación y enraizamiento *in vitro* de *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & planch (palo santo). Provenientes del bosque seco de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*. 6(1). ISSN 2528-7818. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/178/174>

RAY GJ, Brown BJ. 1995. Evaluation of tree propagation techniques. *Restoration Ecology*. 3:86-94. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.1995.tb00081.x>

REBOLLEDO-CAMACHO V, Aparicio-Rentera A, Cruz-Jiménez H. 2006. Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pinos. *Forestal Veracruzana*. 8(2):27-32.

https://www.researchgate.net/publication/242633141_estudio_preliminar_para_la_propagacion_in_vitro_de_dos_especies_de_pinos

RODRÍGUEZ Beraud MM, Latsague Vidal MI, Chacón Fuentes MA, Astorga Brevis PK. 2014. Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja de *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*. 35(1):111-118. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>

RZEDOWSKI J, Medina Lemos R, Calderón de Rzedowski G. 2005. Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera* (Burseraceae). *Acta Botánica Méx.* 70: 85–111. ISSN: 0187-7151. <https://doi.org/10.21829/abm70.2005.989>

SAGARPA. Secretaría de Ganadería Agricultura, Rural, Pesca y Alimentación. 2010. Diagnóstico Sectorial Agropecuario, Pesquero y Recursos Naturales del Estado de Sonora. Pp. 52.

http://smye.info/pagina/documentos/sistemas/eval2014/resultados2014/PDF2/SON/Disgnostico_20_octubre_2010.pdf

SHARRY S, Adema M, Abedini W. 2015. Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Coordinación general: Sandra Sharry; Marina Adema; Walter Abedini. 1a ed. adaptada. Universidad Nacional de La Plata. pp. 240. ISBN 978-950-34-1254-1.

SHRIRAM V, Kumar V, Shitole M. 2008. Indirect Organogenesis and Plant Regeneration in *Helicteres isora* L., an Important Medicinal Plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 44(3):186-193. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9108-3>.

SMITH R. 2012. Plant tissue culture: Techniques and experiments. Londres, UK. Academic Press Elsevier. Pp. 208. ISBN: 9780124159853 <https://www.sciencedirect.com/book/9780124159204/plant-tissue-culture>

SAS. Statistical Analysis System, Institute Inc. 2011. JMP versión 9.0.1. Statistical Discovery. From SAS. USA: Author. A Business Unit of SAS Campus Drive Cary, NC 27513.

TANG W, Newton RJ. 2005. Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus strobes* L.). *Plant Cell Reports*. 24(1):1-9. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0914-3>.

TRIGIANO RN, Gray DJ. 2011. Plant tissue culture, development, and biotechnology. Eds. CRC Press Boca Raton, Florida, USA. Pp. 359-364. ISBN 9781420083262

WANG YL, Fan MJ, Liaw SL. 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. *Botanical Bulletin of the Academia Sinica*. 46:29-34. <https://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2005/1/Bot461-04.html>

YANCHUK A. 2002. Papel e implicaciones de la biotecnología en el sector forestal. Recursos Genéticos Forestales. FAO. AGRIS: International Information System for the Agricultural Science and Technology. UNASYLVA. 204:52-61. ISSN 1020-444X. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2003414013>

Publique seus resultados de pesquisa nas revistas abanico.

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico>