

Micropropagación de *Cissus tiliacea*, planta del sur del estado de México

Micropropagation of *Cissus tiliacea*, plant native of the South of the state of Mexico

José Humberto Jiménez-Martínez ¹
Omar Franco-Mora ¹
María de Guadalupe Gutiérrez-Martínez ²

Andrés González-Huerta ²
Álvaro Castañeda-Vildózola ²

Originales: Recepción: 17/08/2010 - Aceptación: 15/09/2011

RESUMEN

Se micropropagó *Cissus tiliacea*, recurso fitogenético con potencial agronómico y farmacológico, en los medios de cultivo Murashige-Skoog (MS) y Lloyd y McCown (WPM). En ambos medios se generaron resultados similares para número de brotes, nudos, hojas y raíces adventicias, sólo existió diferencia significativa ($p \leq 0,05$) en la formación de callo. Para la multiplicación *in vitro* se utilizó WPM adicionado con 0; 0,5; 1,0; 1,5 ó 2,0 mg L⁻¹ de benciladenina (BA) y se emplearon tres tipos de segmentos nodales (basal, medio y apical). Las concentraciones de 0 y 0,5 mg L⁻¹ de BA resultaron en un mayor tamaño y desarrollo del explante, además permitieron la formación de 1,2 a 1,6 raíces por explante. Las concentraciones de 1,5 y 2,0 mg L⁻¹ de BA indujeron la formación de callo. No existió diferencia significativa en las variables evaluadas por efecto del tipo de segmento nodal establecido *in vitro*. En el enraizamiento, en el medio MS, se evaluaron tres tipos de auxinas: ácido naftalen-1-acético (ANA), ácido indol-3-butírico (AIB) y ácido indol-3-acético (AIA) a 0,5 mg L⁻¹; el mayor número de raíces secundarias y diámetro de la raíz principal fue inducido por ANA, sin embargo AIB indujo

ABSTRACT

Murashige-Skoog (MS) or Lloyd and McCown (WPM) medium were used for micropropagation of *Cissus tiliacea*, an herb plant with potential in agriculture and pharmacology; in both medium similar results for shoot regeneration, number of leaves, leaves nodes, and adventitious roots were observed; only formation of callus was influenced ($p \leq 0.05$) by the medium. For *in vitro* multiplication, benzyl adenine (BA) was added to WPM at 0, 0.5, 1.0, 1.5 or 2.0 mg L⁻¹ and we used three types of explants that is basal, medium an upper. BA at 0 and 0.5 mg L⁻¹ resulted in higher size and well developed plantlets; moreover, those concentrations allowed 1.2 or 1.6 roots per *in vitro* plant. Those explants cultured in 1.5 or 2.0 BA resulted in callus development. Type of explant did not influence the evaluated explants responses. Rooting was evaluated in MS adding naphthalene acetic acid (NAA), indol butiric acid (IBA) or indol acetic acid (IAA) at 0.5 mg L⁻¹; the higher number of secondary roots and the diameter of the main root was induced by NAA, but IBA resulted in longer main roots. Present results suggested that

1 Laboratorio de Horticultura. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Campus Universitario El Cerrillo. Toluca. México. C. P. 50200. ofrancom@uaemex.mx

2 Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Campus Universitario El Cerrillo. Toluca. México. C. P. 50200.

una mayor elongación de la raíz principal. Los resultados del presente trabajo sugieren que el cultivo *in vitro* de *C. tiliacea* es una alternativa para su conservación y multiplicación.

micropropagation of *C. tiliacea* might be an alternative for conservation and multiplication of this wild plant.

Palabras clave

conservación • cultivo *in vitro* • recursos genéticos • segmento nodal • Vitaceae

Keywords

conservation • *in vitro* culture • genetic resources • nodal segment • Vitaceae

INTRODUCCIÓN

La familia Vitaceae comprende alrededor de 165 géneros y 1.370 especies, las cuales están distribuidas a lo largo de los trópicos (21). Lombardi (11) indicó que en el neo-tropico se encuentran cuatro géneros en forma natural: *Ampelocissus* Planch., *Ampelopsis* Michx., *Cissus* L. y *Vitis* L. El género *Cissus* es el más grande, con 350 especies distribuidas a través de África, América, Asia y Australia. En México, se llevan a cabo trabajos para conservar y caracterizar plantas nativas de la familia Vitaceae (4); además, se busca clarificar su potencial farmacológico. Tobar-Reyes *et al.* (27) determinaron variabilidad de distintos genotipos de vid silvestre (*Vitis* spp.) en sus contenidos foliares de resveratrol, un polifenol que posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antifúngicas con acción preventiva en enfermedades del corazón. En *Cissus* también existen moléculas con potencial farmacológico como esteroides, quininas, compuestos fenólicos, antocianinas, saponinas y flavonoides (22).

Cissus tiliacea Kunth se ha reportado en las localidades de Tequisquiapan y Temascaltepec en los estados de Querétaro y México, respectivamente; también en localidades de los estados de Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Distrito Federal y Puebla, en donde es popularmente conocida como "tilia", "sirimo", "tripa de vaca" y "cola del diablo" (23). Es comercializada en los mercados por sus flores. Por tener características de madera suave y ligera, se usa para hacer jícaras, cucharas y bateas. Se tienen registros de que el fruto es utilizado para la elaboración de vino artesanal y, en general, es empleada en la medicina tradicional, recomendada en infusiones para controlar la excitación nerviosa (12).

En el estado de México, específicamente en el municipio de Ocuilan, se han ubicado ejemplares de la especie *C. tiliacea*, a altitudes que van desde los 1.660 a 1.978 m. Dicho territorio forma parte de la Sierra Madre del Sur, el eje volcánico y la cuenca del Balsas, esencialmente de las sierras y valles guerrerenses. La temperatura media anual de la región es de 16,51 a 19,50°C; cuenta con una precipitación media anual de 1.150 mm y un tipo de vegetación de bosque encino (*Quercus ilex* L.) con vegetación secundaria arbustiva y herbácea (25). En las últimas décadas se ha registrado en la región una alta tasa de deforestación, debido al impulso a las actividades agrícolas y ganaderas, además de la construcción de centros recreativos, acciones que han deteriorado y transformado los hábitats de la flora y fauna (6).

El cultivo *in vitro* se ha extendido para abarcar el cultivo aséptico de tejidos, así como el de células y órganos. Es una herramienta de gran importancia empleada en la biotecnología para incrementar poblaciones vegetales de interés, para elaborar y extraer productos de origen natural (*i.e.* almidón, aceites vegetales, etc.). También se utiliza para la fabricación de sustancias útiles en la agroquímica, el mejoramiento de procesos agrícolas, en la ingeniería genética así como en la conservación de recursos fitogenéticos. De esta técnica se deriva la micropropagación, enfocada principalmente al incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo en superficies pequeñas y a bajo costo. Esta técnica, a largo plazo, podría apoyar la recuperación de zonas altamente afectadas por la gran actividad antrópica (18).

Actualmente no se cuenta con registros de la micropropagación de *C. tiliacea*, especie promisoría para su análisis farmacológico y que, por ende, requiere ser conservada como un recurso fitogenético. Además, la micropropagación es una etapa importante para el potencial establecimiento de un banco de germoplasma *in vitro*. Sin embargo, debe experimentarse para obtener la técnica que incremente el potencial regenerativo de cada especie. Por ello, en la presente investigación se tuvo como objetivo determinar una técnica de micropropagación para *C. tiliacea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Planta madre o fase cero

De acuerdo con la metodología de Franco-Mora *et al.* (4), se colectó el material de *C. tiliacea* y con la ayuda de un GPS (GPS 12, Garmin, USA) se registraron las coordenadas del bosque de Ocuilan, Estado de México. Ejemplares de *C. tiliacea* se depositaron en el herbario Eitzi Matuda CODAGEM (Comisión Coordinadora para el Desarrollo Agrícola y Ganadero del Estado de México), y en el invernadero de la colección de trabajo de *Vitis* de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México (FCA/UAEM) se enraizaron estacas y a partir de ellas se obtuvieron los explantes para el establecimiento *in vitro*.

Establecimiento *in vitro* o fase 1

De la planta madre se extrajeron tanto ápices en activo crecimiento, como tallos. En el laboratorio de Biotecnología de la FCA/UAEM se disectaron los segmentos nodales, removiendo previamente las hojas y zarcillos, dejando sólo el ápice y segmentos nodales. Éstos se lavaron durante 25 minutos con una solución de 5 g L⁻¹ de detergente comercial (Roma) en agitación constante.

Posteriormente, los segmentos nodales fueron sumergidos en hipoclorito de sodio al 10% por 12 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada y estéril. Luego, con la finalidad de contrarrestar al máximo el efecto de la oxidación del tejido vegetal, se aplicó una solución antioxidante, la cual constó de una mezcla de ácido cítrico 150 mg L⁻¹ y ácido ascórbico 100 mg L⁻¹ en la cual se sumergieron los explantes y se fueron sacando conforme se empleaban.

Los segmentos nodales se colocaron en tubos de ensayo de 15 cm de largo y 2,5 cm de diámetro, empleando dos medios de cultivo: Murashige y Skoog (MS) (15) y Lloyd y McCown (WPM) (10), adicionados con 0,5 mg L⁻¹ de benziladenina (BA), 20 g L⁻¹ de sacarosa, 0,5 mg L⁻¹ de tiamina y 7 g L⁻¹ de agar. Los medios se ajustaron a pH 5,7 y se esterilizaron en autoclave a 120°C, durante 20 minutos. Una vez establecido el explante, los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2°C con un fotoperíodo de 16 horas. Después de dos meses se determinó el número de brotes, vigor del explante, formación de callo, oxidación de callo, número de raíces, número de hojas, número de nudos y ápices oxidados.

En lo que respecta a la medición del vigor del explante, se asignaron valores con base a una escala categórica: 0 para los explantes oxidados ya muertos, 1 para los que presentaban clorosis, 2 para los que presentaron un buen tamaño y desarrollo y 3 para aquellos explantes que sobresalían de todos los anteriores. En el caso de la formación de callo, de igual manera se realizó una escala en la cual el valor de 0 era ausencia de callo, 1 significaba presencia de callo pequeño, 2 la formación de callo de tamaño regular y 3 la formación de callo mayor.

Multiplicación o fase 2

Se utilizaron segmentos nodales (basal, medio y ápices), denominando basal al segundo nudo de la *in vitro* planta, medio al nudo intermedio y ápice a la parte apical de la planta. Los explantes fueron transferidos a WPM con diferentes concentraciones de BA: 0; 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 mg L⁻¹ suplementados con todas las características mencionadas en los medios anteriores.

Enraizamiento o fase 3

Los explantes extraídos de las etapas anteriores se establecieron en el medio MS adicionado con alguna de tres auxinas diferentes: ácido naftalen-1-acético (ANA), ácido indol-3-butírico (AIB) y ácido indol-3-acético (AIA) a 0,5 mg L⁻¹, respectivamente, con la finalidad de promover la formación de raíces. Las variables a evaluar fueron: número de raíces primarias, número de raíces secundarias, longitud de raíz principal y diámetro de raíz principal, las dos anteriores en milímetros. Para realizar las mediciones correspondientes a longitud y diámetro de raíz principal se empleó el programa ImageJ® y una cámara digital con la cual se tomaron fotografías a las raíces y a un estándar dimensional.

Análisis estadístico

A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANOVA), para las etapas 1 y 3. En la etapa 2 se llevó a cabo un ANOVA bifactorial (concentraciones de BA y segmentos nodales) y posteriormente se efectuó un ANOVA considerando los dos factores de estudio como tratamientos independientes.

El diseño experimental empleado en las tres etapas de la investigación fue completamente al azar con quince repeticiones por tratamiento; cuando el valor de F fue significativo se efectuó una comparación de medias con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Durante la fase 1, los dos medios de cultivo, MS y WPM, indujeron la regeneración de un brote por segmento nodal. Los explantes formaron de 3,4 a 4,6 hojas y de 3,6 a 4 nudos; además, ambos medios indujeron la formación de raíces adventicias. La formación de callo solamente se observó en los explantes colocados en el medio WPM (figura 1); en los callos formados se presentó 33% de oxidación. Por otro lado, se registró la presencia de 10 y 23% de ápices oxidados en los medios MS y WPM, respectivamente y 17,3% de contaminación en los dos medios de cultivo.

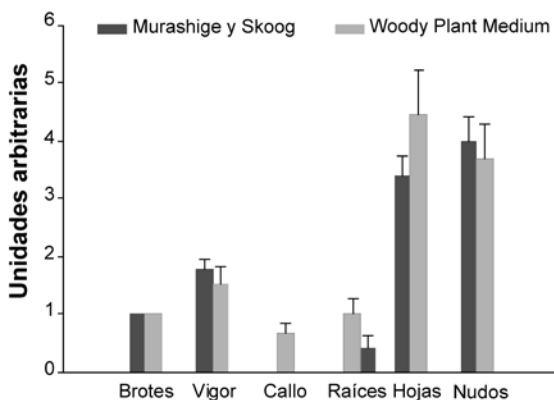


Figura 1. Comportamiento de *Cissus tiliacea*, propagada en dos medios de cultivo. Los datos son la media de 15 repeticiones \pm el EE. Unidades arbitrarias para vigor y callo y unidades para el resto de las barras.

Figure 1. Behavior of *Cissus tiliacea* propagated in two medium formulations. Data are the mean of 15 replications \pm the SE. Arbitrary units for vigor and callus, and units for the other bars.

En la etapa de multiplicación, en el análisis bifactorial, el tipo de explante empleado (basal, medio y apical) no presentó diferencias significativas, pero sí la dosis de BA. Lo anterior se corroboró en el análisis de un factor, específicamente en el segmento apical la concentración de 1,5 mg L⁻¹ fue la que generó un mayor número de nudos. Además, existió una interacción por los factores BA y el tipo de segmento nodal empleado en la siembra, para el número de raíces (tabla 1, pág. 76).

Con respecto a las diferentes concentraciones de BA, se observó que para el número de brotes no hubo diferencias significativas, registrando de 0,8 a 1,6 brotes por explante. Sin embargo, 0 y 0,5 mg L⁻¹ BA fueron las que generaron mayor valor, de 2,2 a 2,6 en la escala de vigor de explante. Una mayor formación de callo se observó a 1,5 y 2,0 mg L⁻¹ BA, seguido de las concentraciones a 0,5; 1,0 y 0 mg L⁻¹; en general, la presencia de oxidación en el callo fue mínima. Para raíces se presentaron diferencias significativas en las concentraciones de 0 y 0,5 mg L⁻¹ de BA con respecto al resto de las concentraciones, ya que permitieron el desarrollo de 1,2 a 1,6 raíces adventicias por brote. Pese a que las diferencias no fueron significativas en número

de hojas y nudos, éstas presentaron rangos de 2,8 a 6 hojas y 2,2 a 4,2 nudos por explante, respectivamente (tabla).

Tabla. Efecto de la benzyladenina (BA) y el segmento nodal en el establecimiento *in vitro* de *Cissus tiliacea*.

Table. Effect of the benzyladenine (BA) and the type of shoot in the establishment *in vitro* of *Cissus tiliacea*.

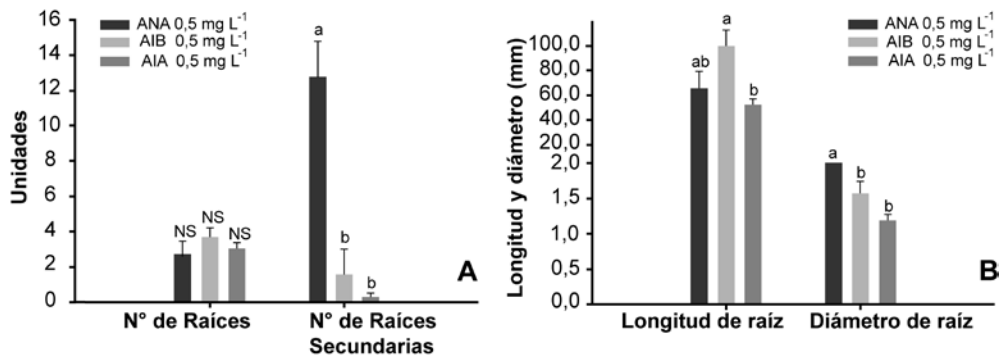
Segmento nodal	BA (mg L ⁻¹)	Brotos N°	Vigor N° Escala	Callo N° Escala	Raíces N°	Hojas N°	Nudos N°					
	0,0	1,0	2,2	A	0,2	B	1,4	A a	2,8	B	2,4	
	0,5	1,4	2,4	AB	0,2	AB	0,4	A b	4,8	AB	3,6	
Basal	1,0	1,6	1,8	AB	0,4	AB	0,0	B b	5,2	AB	2,4	
	1,5	0,8	1,7	B	0,8	A	0,0	B b	3,4	AB	2,2	
	2,0	1,2	2,2	AB	1,4	A	0,0	B b	5,4	A	2,2	
	F	1,2	0,8	2,4	15 ***	1,0	0,5					
	0,0	1,0	2,6	A	0,0	B	1,2	A a	3,2	B	2,2	
	0,5	1,2	2,2	AB	0,4	AB	1,2	A a	4,4	AB	3,0	
Medio	1,0	1,2	2,0	AB	0,6	AB	0,0	B b	4,4	AB	2,6	
	1,5	1,0	1,8	B	0,8	A	0,2	B ab	4,2	AB	2,2	
	2,0	1,4	2,2	AB	0,8	A	0,0	B b	6,0	A	4,0	
	F	0,4	1,1	1,1	6,1 **	0,9	1,7					
	0,0	1,0	2,6	A	0,0	B b	1,6	A a	2,8	B	2,8	A b
	0,5	1,2	2,2	AB	0,8	AB a	1,6	A a	4,6	AB	3,6	A b
Apical	1,0	1,4	2,0	AB	0,0	AB b	0,0	B b	4,0	AB	2,2	B
	1,5	1,6	2,0	B	1,0	A a	0,0	B b	5,8	AB	4,2	A
	2,0	1,4	2,0	AB	0,8	A a	0,0	B b	4,4	A	3,4	A b
	F	0,8	1,7	4,1*	32 ***	2,0	4,5**					
BA	1,0	2,6	*	4,8	**	35	***	2,3	1,7			
Segmentos nodales	0,4	0,1	0,0	2,6	*	0,0	1,3					
BA x SN	0,5	0,3	0,9	2,1	*	0,4	1,2					

Probabilidades limites en ANOVA con dos factores. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; ns: $p < 0,05$. Letras mayúsculas distintas en cada columna indican diferencias significativas en un análisis bifactorial (Tukey, $p < 0,05$). Letras minúsculas en cada columna indican diferencias significativas en un análisis factorial (Tukey, $p < 0,05$). Factores: Tratamiento de BA y segmento nodal empleado.

Limits of probability in ANOVA with two factors. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Data with different capital letters within the column are statistically different in a two-factor analysis (Tukey, $p < 0,05$). Data with different small letters are statistically different in a single factor analysis (Tukey, $p < 0,05$). Factors: BA doses and tissue segment (SN).

En la etapa de enraizamiento, entre las tres auxinas no existieron diferencias significativas en el número de raíces primarias, regenerándose de 2,6 a 3,6 raíces adventicias por brote. Por otro lado, ANA indujo 12,7 raíces secundarias, diferenciándose ($p < 0,05$) de AIB y AIA.

También la longitud de la raíz se vio influenciada por el tipo de auxina empleada: con AIB se logró una mayor elongación ($p < 0,05$), seguida de ANA y AIA. No obstante, con ANA se obtuvo un mayor diámetro ($p < 0,05$) en la raíz principal con 3,7 mm, seguido de AIB y AIA (figura 2).



Letras distintas en cada variable indican diferencias significativas entre tratamientos al $p < 0,05$.
 Values with different letter in each variable shown differences among treatments ($p < 0.05$).

Figura 2. A) Número de raíces principales y secundarias de *Cissus tiliacea* cultivada *in vitro* con tres auxinas diferentes. **B)** Longitud de raíz y diámetro de raíz principal de *Cissus tiliacea* cultivadas *in vitro* con tres auxinas diferentes.

Figure 2. A) Number of main and secondary roots of *Cissus tiliacea* cultivated with three different auxins. **B)** Longitude and diameter of the main root of *Cissus tiliacea* cultivated with three different auxins.

DISCUSIÓN

No existió diferencia notable en el uso de dos medios de cultivo, MS y WPM, para micropropagar *C. tiliacea*. Las diferencias en la formación de callo pudieron deberse a los macro-nutrientes presentes y el potencial osmótico en los diferentes medios de cultivo. La fuente carbonada del medio, que actúa como fuente energética y en algunos casos como regulador osmótico, promueve la formación de callo (20). Molinos *et al.* (14) señalan -0,230 y -0,065 MPa de potencial osmóticos en MS y WPM, respectivamente, mientras que Santos *et al.* (24) indicaron que para inhibir la deformación del material inicial y promover una compactación de los brotes, se debe inducir un ligero déficit hídrico mediante la adición al medio de agentes osmóticos que atrapen las moléculas del agua y, por tanto, reduzcan el potencial de agua en el medio.

Por otro lado, la relación Ca^{2+} / K^{+} presente en MS es 1:6,7 y en WPM es 1:0,4 lo cual es de gran importancia en el balance iónico y potencial osmótico del medio de cultivo; ambos factores determinantes en el crecimiento de las *in vitro* plantas (14). Bretón *et al.* (3) señalaron que el aumento de la dosis de cobre en el medio de cultivo MS permitió incrementar la producción de callos verdes, fotosintéticamente activos, en lino (*Linum usitatissimum* L.).

La presencia de oxidación en los ápices pudo deberse a los problemas asociados con deficiencias de Ca^{2+} ya que en especies leñosas existe la baja movilidad del ión (14). Por su parte, Sha *et al.* (26) mencionaron que en la mayoría de los trabajos realizados con vid, miembro de Vitaceae, al igual que *Cissus*, ha sido frecuente la presencia de necrosis apical propiciada por desbalances iónicos y relaciones nutricionales.

El efecto estimulante de las citocininas en la proliferación y crecimiento de brotes en especies de Vitaceae es bien conocido. Guerrero *et al.* (5) propagaron dos portainjertos de vid (Paulsen 1103 y Vr 04343) y encontraron la necesidad de adicionar 6-benzylaminopurina (BAP) en el medio MS, para obtener vástagos y hojas. En la presente investigación, las concentraciones de BA empleadas en la etapa de multiplicación de *C. tiliacea* permitieron una ligera regeneración de brotes por explante. Esta respuesta difiere del incremento en brotes por explante de *Vitis vinifera* L. cv. Napoleón, empleando BA en concentraciones mayores de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ (7). Como es bien sabido, el genotipo de las plantas influye significativamente en la respuesta morfogénica en el cultivo *in vitro* (2). Además, la dosis y la combinación de reguladores del crecimiento pueden influir en los resultados esperados en cada especie estudiada. Olivera-Ortega *et al.* (16) señalaron que los requerimientos del tipo y concentración de citocininas son extremadamente variables y dependen también del contenido endógeno en cada especie. Marulanda *et al.* (13) mencionaron que el balance auxina-citocininas es determinante en el coeficiente de multiplicación, por lo que al lograr un balance adecuado es posible alcanzar elevadas tasas de proliferación. La realización de nuevos trabajos en los cuales se evalúen mayores concentraciones de BA, además de combinaciones con auxinas, será necesaria para mejorar la eficiencia de multiplicación *in vitro* de *C. tiliacea*.

Las *vitro* plantas de *C. tiliacea* que presentaron mayor tamaño fueron aquellas cultivadas con 0 y $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BA, sugiriendo que las concentraciones endógenas de citocininas son adecuadas para la regeneración de brotes, o bien, que esta especie no requiere demasiadas citocininas para dicho proceso.

Por otro lado, Marulanda *et al.* (13) señalaron que el incremento de BA aumenta de manera significativa la producción de callo, lo cual se observó en este trabajo. Asimismo, indicaron que la formación de callos en el proceso de multiplicación no es deseable, por lo que es preferible emplear en el medio de cultivo la concentración menor de BA.

Las concentraciones 0 y $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BA permitieron la formación de raíces adventicias que crecieron más eficientemente en la parte media y apical del segmento nodal empleado, lo cual sugiere una posible presencia diferencial de hormonas endógenas en cada sección del explante. El medio sin BA pero con auxinas formó raíces ya que, como lo indican Latsague *et al.* (9), las auxinas favorecen la formación de raíces adventicias, debido a que modifican la extensibilidad celular, al producir factores que ablandan la pared. Por otro lado, se sabe que diversas concentraciones de citocininas suprimen la dominancia apical en las plantas, lo cual causa la brotación de las yemas laterales y la inhibición de la formación y crecimiento de las raíces (8), esto último logrado en *C. tiliacea* con la adición de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BA.

En este trabajo, en la etapa de multiplicación (específicamente en los tratamientos sin hormonas) se regeneraron raíces adventicias; sin embargo, en la etapa de enraizamiento, el medio de cultivo adicionado con las auxinas ANA, AIB y AIA indujeron un mayor número de raíces, con respecto a la etapa de multiplicación.

Se ha indicado que las auxinas promueven la formación de las raíces laterales y adventicias, además de participar en la inhibición correlativa de las yemas axilares y brotes (8). Por su parte, Quintero *et al.* (19) indicaron que en *Dioscoreas* sp., al aumentar la concentración de ANA, el número de raíces fue mayor pero también se incrementó la formación de callo y la oxidación del medio de cultivo.

ANA indujo una mayor formación de raíces secundarias con respecto a las otras dos auxinas, sugiriendo una mayor sensibilidad de la célula a ANA para inducir este tipo de raíces. Por otro lado, AIB indujo una mayor elongación en la raíz principal. Parada y Villegas (17) reportaron mayor longitud de raíces en el híbrido "almendro (*Prunus amygdalus* Batsch). x durazno (*Prunus persica* L.) H1" con 0,1 μM AIB. En el caso de *Cissus*, nuevamente ANA indujo un mayor diámetro de raíz y, en general, una mejor respuesta a las variables evaluadas. Esto concuerda con lo reportado por Al-Maarri *et al.* (1), quienes mencionaron que 0,2 mg L⁻¹ de ANA indujo la formación de raíces de buena calidad en *Pyrus communis* L., mientras que la menor formación de raíces fue con AIA.

Por otro lado, Quintero *et al.* (19) indicaron que al aumentar la concentración de ANA se obtuvieron raíces con mayor diámetro en *Dioscoreas* sp., de manera similar a lo observado con *Cissus tiliacea*. Parada y Villegas (17) indicaron que el tiempo de permanencia del explante en el medio de cultivo en la etapa de enraizamiento está en función del tamaño de raíz, además de que los explantes con estas características dan mayor oportunidad de sobrevivencia en la etapa de aclimatación.

CONCLUSIONES

En la presente investigación se logró la micropropagación de *Cissus tiliacea*, por lo que se considera un método efectivo para la propagación de este recurso fitogenético y con ello su potencial conservación. Sin embargo, se deben realizar nuevas investigaciones con la finalidad de obtener mejores resultados. El establecimiento *in vitro* es posible en cualquiera de los dos medios de cultivos evaluados: MS y WPM. Las concentraciones 0 y 0,5 mg L⁻¹ de BA fueron las dosis más adecuadas para el establecimiento y multiplicación *in vitro*, mientras que para la etapa de enraizamiento, la auxina ácido naftalén acético propició un mayor diámetro de la raíz principal y mayor número de raíces secundarias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Al-Maarri, K.; Arnaud, Y.; Miginiac, E. 1994. Micropropagation of *Pyrus communis* cultivar 'Passe Crassane' seedlings and cultivar 'Williams': factors affecting root formation *in vitro* and *ex vitro*. *Sci. Hortic.* 58: 207-214.

2. Andrade-Rodríguez, M.; López-Peralta, M. C.; González-Hernández, V. A.; García-Velázquez, A.; Peña-Lomelí, A. 2005. Efecto del genotipo en la micropropagación de tomate de cáscara. *Rev. Chapingo Serie Horticultura*. 8: 183-196.
3. Bretón, A.; Dittrich, A.; Castillo, N.; Sosa, A.; Corona, M. V. 2007. Evaluación de la respuesta en la formación de callos regenerantes a partir de cultivo *in vitro* de epicótilos y entrenudos de lino (*Linum usitatissimum* L.) ante el incremento de la concentración de cobre en el medio de cultivo. *Rev. Cient. Agropec.* 11: 95-101.
4. Franco, O.; Cruz, J. G.; Cortes, A. A.; Rodríguez, A. C. 2008. Localización y usos de vides silvestres (*Vitis* spp.) en el estado de Puebla y México. *Ra Ximhai* 4: 151-165.
5. Guerrero, D. R.; Mroginski, L. A.; Krivenky, M. A.; Dominguez, M. C. 2010. Micropropagación de portainjertos de vid de interés para la provincia de Misiones. *Revista Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina.* 42(2): 143-159.
6. Hernández, C.; Lorente, J.; Vargas, I.; Martínez, A. L. 2008. Las mariposas (Hesperioidea y Papilionoidea) de Malinalco, Estado de México. *Rev. Mex. Biodiv.* 79: 117-130.
7. Ibáñez, A.; Valero, M.; Morte, A. 2003. Influence of cytokinins and subculturing on proliferation capacity of single-axillary-bud microcuttings of *Vitis vinifera* L. cv. Napoleón. *An. Biol.* 25: 81-90.
8. Jankiewicz, L. S. 2003. Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Mundi-Prensa. México, D. F. 487 p.
9. Latsague, M.; Sáez, P.; Yáñez, J. 2009. Efecto del ácido indolbutírico en la capacidad rizogénica de estacas de *Eucryphia glutinosa*. *Bosque* 30: 102-105.
10. Lloyd, G. B.; McCown, B. H. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Proc. Int. Plant Propagators Soc.* 30: 421-437.
11. Lombardi, J. A. 2007. Systematics of Vitaceae in South America. *Can. J. Bot.* 85: 712-721.
12. Martínez, M.; Matuda, E. 1979. Flora del Estado de México. Libros de México. México, D. F. p. 246-251.
13. Marulanda, M. L.; Carvajalino, M.; Vento, H. 2000. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de plantas seleccionadas de *Rubus glaucus* Benth para el departamento de Risaralda (Colombia). *Actual Biol.* 22: 121-129.
14. Molinos da Silva, C.; Villegas Monter, A.; Sánchez García, P.; Alcántar González, G.; Rodríguez Mendoza, M. N.; Ruíz Posadas, L. M. 2004. Efectos del potencial osmótico y contenido de Ca en el medio de cultivo sobre la distribución de Ca²⁺ y K⁺, producción de biomasa y necrosis apical de vid "R110". *Interciencia* 29: 384-388.
15. Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultur. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
16. Olivera-Ortega, V. Z.; Gutiérrez-Espinosa, M. A.; Gutiérrez-Espinosa, J. A.; Andrade-Rodríguez, M. 2000. Cultivo *in vitro* de gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero. *Bioagro* 12: 75-80.
17. Parada, D. M.; Villegas, A. 2009. Propagación *in vitro* del híbrido almendro x durazno H1. *Rev. Fitotec. Mex.* 32: 103-109.
18. Pedroza, J. A.; Bejarano, A. 2008. Propagación vegetativa *in vitro* de *Puya santossi*. *Rev. Col. Biotec.* 10: 36-48.
19. Quintero, I.; Polo, J.; Jarma, A.; Espitia, A. 2003. Enraizamiento *in vitro* de *Dioscoreas* sp. *Rev. Col. Biotec.* 5: 51-56.
20. Roca, W. M.; Mroginski, L. A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali, Colombia. 970 p.
21. Rodrigues, E.; Gonçalves, J. R.; Raquel, F. F.; Freitas, R. P.; Lindoso, G. B. 2006. The action of extract of the dry leaves of *Cissus sicyoides* L. in pregnant rats. *Acta Farm. Bonaerense* 25: 421-424.

22. Rodrigues, E.; de Oliveira, K. R.; Lindoso, G. B.; Matos, A. B. 2009. Anxiolytic and anticonvulsant effects on mice of flavonoids, linalool, and - tocopherol presents in the extract of leaves of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). J. Biomed. Biotech. 6 p.
23. Rzedowski, J.; Calderón, G. 2005. Flora del bajo y de regiones adyacentes. Fascículo 131. Vitaceae. Instituto de Ecología. Pátzcuaro, Michoacán. 31 p.
24. Santos, M. S.; Campo, J. M. M.; Arredondo, A.; Santos, M. L. 2001. Efecto del medio de cultivo, cinetina y agentes osmóticos sobre la respuesta morfogenética de *Astrophytum myriostigma* (Cactacea) *in vitro*. Rev. Fitotec. Mex. 24: 133-138.
25. Secretaría de Desarrollo Urbano, Gobierno del Estado de México (SEDEU). 2007. Plan Estatal de Desarrollo Urbano, Cartas topográficas 1: 20.000. D-07, D-08, D-09 y D-10. Estado de México.
26. Sha, L.; McCown, B. H.; Peterson, L. A. 1985. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. J. Am Soc. Hortic. Sci. 110: 631-634.
27. Tobar-Reyes, J. R.; Franco-Mora, O.; Morales-Rosales, E. J.; Cruz-Castillo, J. G. 2009. Contenidos de resveratrol en hojas de vides silvestres (*Vitis* spp.) mexicanas. Revista de la Facultad Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina. 41(2): 127-137.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma del Estado de México por el financiamiento parcial del presente trabajo a través del proyecto 2486/2007 a cargo de Omar Franco-Mora.

A CONACYT-México por otorgar la beca para el estudio de Maestría de José Humberto Jiménez-Martínez.