

Efecto de nutrientes y sacarosa en la germinación y desarrollo de vitroplantas de *Salix bonplandiana*

O. I. Camacho Moreno^{1,2}, M. I. Montero-Cortés², J.J Castañeda Nava¹, J. A. Qui Zapata¹, A. Gutiérrez Mora^{1*}

¹Unidad de Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C, Camino Arenero 1227, El Bajío, 45019 Zapopan, Jalisco México.

²Instituto Tecnológico de Tlajomulco/TecNM, Km. 10 Carr. Tlajomulco-San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, 45640, México.

*agutierrez@ciatej.mx

Área de participación: Ingeniería Química

Resumen

El sauce (*Salix bonplandiana*) es una planta vivípara. En condiciones naturales tarda en germinar 12 a 24 horas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la germinación y desarrollo de la plántula de (*S. bonplandiana*) en cultivo *in vitro* durante 30 días en concentraciones de 0%, 50%, 100%, 150% de medio Murashige y Skoog 1962 (MS) y 0, 1.5% y 3% de sacarosa. La germinación de la semilla se registró en todos los tratamientos a las 24 horas, y el mejor desarrollo de la plántula (longitud de explante, número de hojas y número de raíces) se observó con los medios 150% MS con 1.5% de sacarosa, 100% MS con 3% de sacarosa y 100% MS con 1.5% de sacarosa, al no presentar diferencias significativas entre estos medios es conveniente usar los medios con menor concentración para la propagación *in vitro*.

Palabras clave: Medio MS, Sauce, sacarosa, germinación.

Abstract

The willow (*Salix bonplandiana*) is a viviparous plant. In natural conditions it takes 12 to 24 hours to germinate. The objective of this work was to evaluate the germination and development of the (*S. bonplandiana*) seedling in *in vitro* culture for 30 days in concentrations of 0%, 50%, 100%, 150% of Murashige and Skoog 1962 (MS) medium. and 0, 1.5% and 3% sucrose. Seed germination was recorded in all treatments at 24 hours, and the best development of the seedling (length of explant, number of leaves and number of roots) was observed with 150% MS media with 1.5% sucrose, 100% MS with 3% sucrose and 100% MS with 1.5% sucrose, as there are no significant differences between these media, it is convenient to use the media with lower concentration for *in vitro* propagation.

Key words: MS medium, *Salix*, sucrose, germination

Introducción

El género *Salix* consiste en alrededor de 300 especies, son árboles y arbustos caducifolios que se encuentran en una amplia gama de hábitats (riberas de ríos, dunas de arena y áreas montañosas). Diversas especies de *Salix* se caracterizan por presentar adaptaciones fisiológicas particulares. Por lo tanto, la importancia económica de la especie está aumentando y emergiendo en una amplia gama de aplicaciones prácticas para restaurar ecosistemas dañados, incluida la restauración de ecosistemas dañados [1]. Sin embargo, recientemente se ha detectado una enfermedad vegetal emergente, referida como muerte regresiva por *Fusarium* o "Fusarium dieback (FD)" por sus siglas en inglés, la cual se ha detectado en varias plantas en California y Florida. FD es causado por los efectos combinados de un escarabajo (Scolytinae) con un complejo ambrosial *Euwallacea fornicatus* y su compañero fúngico simbiótico *Fusarium euwallaceae*. Los escarabajos hembras adultas excavan en un árbol, creando galerías de cría más allá del cambium, que son simultáneamente

inoculado con *Fusarium sp.* El hongo coloniza las paredes de la galería y se convierte en la única fuente de alimento para desarrollo de larvas y escarabajos adultos. El hongo invade el tejido vascular del árbol, bloqueando el agua y los nutrientes de las raíces al resto del árbol, eventualmente causando la muerte de las ramas y muerte del árbol [2]. Diferentes estudios demuestran que la muerte regresiva causada por *F. Euwallaceae* y su vector *E. fornicatus*, afectan a numerosas familias de árboles, así como especies de cultivos, madera y ornamentales. La globalización y los modernos medios de transporte, han eliminado las barreras naturales que aislaban los complejos ambrosiales, facilitando la introducción de los mismos en nuevas áreas e incrementando el riesgo latente de una nueva asociación del hongo (*Fusarium euwallaceae*) con un escarabajo nativo que afecte diversas especies de sauce incrementando el riesgo de infestación [3], causando grandes pérdidas de plantas susceptibles al complejo ambrosial como son los árboles de Sauce (*Salix sp.*). Por lo anterior es imprescindible generar estrategias que estimulen mecanismos de defensa en plantas de Sauce que permitan resistir la enfermedad [4].

La propagación convencional de plantas de *Salix* se puede dificultar debido a que las semillas presentan un periodo de viabilidad corto y la producción de estacas puede verse afectada por un crecimiento reducido y una latencia estacional [5]. Por lo que es importante generar estrategias biotecnológicas que acorten los periodos de propagación de plantas de *Salix* como es la micropropagación *in vitro*.

Algunas sales minerales ayudan al crecimiento de plantas en diferentes ecosistemas, que brindan alimento y hábitat para una gran variedad de organismos en estos ecosistemas. Sin embargo, cuando se presenta un exceso de sales minerales en el medio, generalmente es causado por diversas actividades humanas que contaminan el agua y el suelo. Las fuentes principales de contaminación en los suelos son la agricultura con el exceso de fertilizante junto con el estiércol animal aplicado a cultivos y campos, las aguas pluviales, las aguas residuales, combustibles fósiles por la generación de energía eléctrica, así como desechos de la industria aumentan la contaminación de suelos y mantos freáticos. Plantas con elevada biomasa, tales como los sauces, pueden utilizarse para la fitorremediación de terrenos, en la que se aplican especies vegetales que ayudan a la absorción, translocación y degradación de altas cantidades de sales minerales y metales tóxicos [6] [7].

La propagación sexual se logra por medio de semillas, por siembra directa: Los estudios revelan que cerca del 90 % sobrevive con métodos de siembra directa y por regeneración natural [8].

El cultivo *in vitro* o micropropagación se presenta como una excelente alternativa para superar las dificultades antes mencionadas de los métodos tradicionales, ya que por medio de esta técnica es posible germinar y reproducir clones con alto valor genético y conseguir plantas de alta calidad que pueden llegar incluso a triplicar la velocidad de su multiplicación [9]. En algunos estudios anteriores el uso del medio MS para la propagación de plantas de Sauces en cultivo *in vitro* presenta una buena respuesta en la generación de yemas axilares de sauce [10], además, se ha observado que el aumento en la concentración de sacarosa (mayor a 3% de sacarosa) no favorece el enraizamiento, ni la formación del número de raíces [11], por lo anterior en este estudio se empleó una concentración máxima de 3% de sacarosa. El propósito de este estudio fue evaluar bajo condiciones *in vitro*, la germinación de semillas y su desarrollo vegetativo en diferentes concentraciones de medio MS, en combinación con distintas concentraciones de sacarosa (0%, 1.5% y 3%) en el medio de cultivo [12].

Metodología

Establecimiento de semillas de *Salix* en medio MS

Se recolectaron frutos del sauce (*S. bonplandiana*) (Figura 1A) y se seleccionaron las cápsulas con una coloración verde y amarilla, que contienen las semillas viables, mientras que las cápsulas con una coloración café y negra fueron eliminadas (semillas no viables), (Figura 1B). Se extrajeron entre cinco a seis semillas de cada cápsula en condiciones asépticas eliminando el apéndice plumoso

(Figura 1C), después del proceso de desinfección las semillas fueron establecidas en condiciones *in vitro* en los diferentes tratamientos de medio de cultivo para el evaluar el desarrollo de las plántulas (Figura 1D).

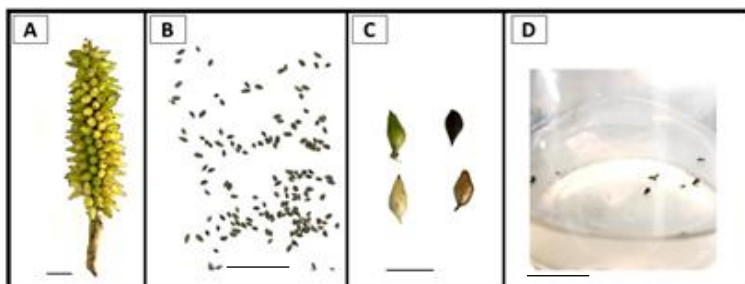


Figura 1. Establecimiento de semillas cigóticas de plantas de *Salix* en cultivo *in vitro*. A. Frutos; B y C. Semillas; D. Semillas establecidas en medio de cultivo *in vitro*. Barra = 0.5 cm.

Establecimiento de semillas en cultivo *in vitro*

Los frutos se recolectaron en noviembre del 2019 en Zapopan en el Estado de Jalisco, México (coordenadas DMS 20° 41' 55.69" N 103° 28' 36.72" O). En condiciones asépticas las cápsulas fueron separadas del fruto y se disectaron cuidadosamente para extraer las semillas. Las semillas se colocaron en una solución de cloro comercial al 1% (v/v) durante 15 min., posteriormente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril. Las semillas fueron transferidas al medio de cultivo MS [13] con variaciones en las concentraciones de sales (macroelementos y microelementos). El medio fue adicionado con 8 g L⁻¹ de agar sin reguladores de crecimiento. El medio fue ajustado a un pH de 5.8 con NaOH después se esterilizó durante 15 min. a una temperatura de 121°C).

Evaluación del efecto de sales y carbohidratos en la germinación de semillas y desarrollo de vitroplantas de *Salix*.

Para evaluar el efecto de las sales (macronutrientes y micronutrientes) y vitaminas del medio de cultivo MS [13], se emplearon diferentes concentraciones del medio MS con 0, 50, 100 y 150% (v/v), en el testigo se colocó agua destilada "0 % (v/v) MS. También se evaluó el efecto de la concentración de carbohidratos (sacarosa) en la germinación y el desarrollo de plántulas a partir de semillas. Se diseñó un experimento con los siguientes tratamientos: T1. Control (0 % (v/v) MS sales y 0 % (p/v) de sacarosa), T2. 0 % (v/v) MS sales y 1.5 % (p/v) de sacarosa, T3. 0 % (v/v) MS sales y 3 % (p/v) de sacarosa, T4. 50 % (v/v) MS sales y 0 % (p/v) de sacarosa, T5. 50 % (v/v) MS sales y 1.5 % (p/v) de sacarosa, T6. 50 % (v/v) MS sales y 3 % (p/v) de sacarosa, T7. 100 % (v/v) MS sales y 0 % (p/v) de sacarosa, T8. 100 % (v/v) MS sales y 1.5 % (p/v) de sacarosa, T9. 100 % (v/v) MS sales y 3 % (v/v) de sacarosa, T10. 150 % (v/v) MS sales y 0 % (p/v) de sacarosa, T11. 150 % (v/v) MS sales y 1.5 % (p/v) de sacarosa, T12. 150 % (v/v) MS sales y 3 % (p/v) de sacarosa. Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2 ° C con un fotoperiodo de 16h luz (blanca) /8h oscuridad. Se evaluó el porcentaje de germinación a las 24 horas de establecido el cultivo y los parámetros de desarrollo de la plántula se evaluaron cada 10 días. Los parámetros de desarrollo de la planta incluyeron: longitud del explante (LE), número de hojas (NH), número de raíces (NR) y longitud de raíces (LR). Este último parámetro se consideró una escala del 1 al 3, en el que se les asignó el valor como se explica a continuación:

1. Raíces con longitud de 1 a 5mm.
2. Raíces con longitud de 6mm a 1.5cm
3. Raíces con longitud de 1.6 cm a 3 cm.

Diseño experimental y análisis de datos

Se empleó un diseño experimental completamente al azar los datos presentados corresponden a tres repeticiones con 4 semillas por tratamiento. Los datos obtenidos durante el experimento se

sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias se determinó por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Resultados y discusión

Germinación de semilla en medio MS

En cuanto al porcentaje de germinación en semillas de *S. bonplandiana*, se presentó una germinación del 100 % en todas las semillas establecidas en cultivo *in vitro* a las 24h, lo que indica que la variación de la concentración de medio MS y la variación en la concentración de sacarosa en el medio de cultivo no influye en la germinación de las semillas de *S. bonplandiana* comparado con un estudio en el que se hizo con semillas de *Salix variegata* donde se reportó que la viabilidad de las semillas tienen una duración de 10 días después de salir de la cápsula, por otro lado se ha reportado que en las primeras 24 horas se puede tener hasta el 95% de germinación en sustrato [14].

Desarrollo de plántulas a partir de semillas en medio MS

El desarrollo de cada tratamiento comenzó a observarse a los 10 días de cultivo *in vitro* (Tabla 1), los tratamientos T8, T9 y T11 presentan los más altos parámetros de desarrollo evaluados, en el caso de la longitud del explante (LE) se obtuvieron valores entre 0.52 a 0.63 cm, en el caso del número de hojas (NH) se presentaron valores entre 1 a 1.83 en estos tratamientos y también se observó la generación del sistema radicular, tanto en el número de raíz (NR), como en la longitud de la raíz (LR).

Tabla 1. Evaluación de parámetros de desarrollo de plántulas de *Salix* en el día 10 de cultivo *in vitro*

Tratamiento	LE [cm] ^{o*}	NH ^{o*}	NR ^{o*}	LR ^{o*}
T1	0.33±0.03de	0.00±0.00c	1.00±0.00b	1.00±0.00d
T2	0.30±0.02e	0.00±0.00c	1.00±0.00b	1.41±0.15cd
T3	0.39±0.04cde	0.00±0.00c	1.00±0.00b	2.00±0.00ab
T4	0.46±0.06bcde	0.00±0.00c	0.33±0.14c	0.33±0.14e
T5	0.53±0.03abc	0.50±0.26bc	1.17±0.11ab	1.67±0.14abc
T6	0.65±0.03a	0.50±0.26bc	1.75±0.22a	1.67±0.14abc
T7	0.51±0.05abc	0.67±0.28bc	1.08±0.08b	1.17±0.11cd
T8	0.63±0.04ab	1.00±0.30ab	1.42±0.26ab	1.58±0.15bc
T9	0.52±0.04abc	1.67±0.22a	1.50±0.23ab	1.25±0.13cd
T10	0.40±0.04cde	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00e
T11	0.54±0.04abc	1.83±0.167a	1.58±0.15ab	2.17±0.11a
T12	0.50±0.02abcd	1.33±0.28ab	1.08±0.08b	2.08±0.08ab

^oLE.- Longitud de explante, NH.- número de hoja, NR.- número de raíz, LR.- longitud de raíz

*En la Tabla se representa la media con la desviación estándar y las diferentes letras entre columnas denotan diferencia significativa ($P < 0.05$)

A los 20 días de cultivo los tratamientos que muestran mayor valor en los parámetros de LE, NH y NR fueron T7, T8 y T11 presentando una longitud del explante (LE) de 0.9, 1.02 y 0.89 cm respectivamente. Con respecto al número de hojas los valores se encuentran entre 2.5 y 3.75, estos tratamientos también generaron el sistema radicular. En controversia con este estudio los explantes de *Berberidosis corallina* cultivados en medio MS presentan necrosis en el tejido debido al alto contenido de nitrógeno en el medio de cultivo [15]. Mientras que en *Salix bonplandiana* se puede observar que los medios de cultivo MS con 150 %, 100 % y 50 % (v/v) tienen un efecto positivo en la disponibilidad de nutrientes y la influencia de la fisiología de la planta que se ve marcada sobre la respuesta *in vitro*.

Tabla 2. Evaluación de parámetros de desarrollo de plántulas de *Salix* a los 20 días de cultivo *in vitro*

Tratamiento	LE [cm] ^{o*}	NH ^{o*}	NR ^{o*}	LR ^{o*}
T1	0.36±0.03d	0.00±0.00e	1.58±0.23abc	1.67±0.14de
T2	0.40±0.04d	0.00±0.00e	2.33±0.19abc	2.67±0.14ab
T3	0.49±0.05cd	0.00±0.00e	3.08±0.38a	3.00±0.00a
T4	0.55±0.08cd	0.00±0.00e	1.08±0.08bc	1.17±0.11ef
T5	0.71±0.04bc	1.16±0.30de	2.75±0.86ab	2.17±0.24bcd
T6	0.85±0.03ab	1.33±0.28cd	2.92±0.29a	2.67±0.14ab
T7	0.90±0.04ab	2.50±0.38abc	1.83±0.21abc	1.92±0.23cd
T8	1.02±0.05a	3.00±0.35ab	2.75±0.31ab	2.67±0.14ab
T9	0.90±0.08ab	1.92±0.48bcd	2.67±0.40ab	2.67±0.14ab
T10	0.49±0.04cd	1.00±0.30de	0.75±0.18c	0.67±0.14f
T11	0.89±0.06ab	3.75±0.25a	2.67±0.26ab	2.92±0.08a
T12	0.70±0.05bc	3.00±0.30ab	2.25±0.28abc	2.50±0.15abc

^oLE.- Longitud de explante, NH.- número de hoja, NR.- número d raíz, LR.- longitud de raíz

*En la Tabla se representa la media con la desviación estándar y las diferentes letras entre columnas denotan diferencia significativa (P<0.05)

Altura de las plantas a los 30 días

A los 30 días de cultivo *in vitro* los explantes con mayor altura se observaron en T11 con una concentración de medio MS al 150 % (v/v) y 1.5 % (p/v) de sacarosa, presentando una altura de 1.31 cm, al igual que los tratamientos T8, T9 con 12.4 y 11.5 cm respectivamente, así como en T7 y T12 con 11.4 cm. La longitud de los explantes fue menor en los tratamientos con una concentración de 0% (v/v) de medio MS (T1, T2, T3), así como en los tratamientos T4 y T10 donde no se tenía sacarosa en el medio de cultivo. Los tratamientos T6 y T9 con 50 % y 100 % de medio MS respectivamente no presentan diferencia significativa en la altura de los explantes, resultados similares se obtuvieron en estudios efectuados en catleya, donde utilizaron medio MS al 25, 50 y 100 % (v/v) para la germinación y desarrollo de plántulas de catleya, en la que no se presentó diferencia significativa en la altura de los explantes [16]. Sin embargo, en este estudio la disminución de sacarosa en los tratamientos con 50% de medio MS como son T4 y T5, con una reducción en la concentración de sacarosa de 1.5 % y 0% respectivamente afecta negativamente en la longitud del explante (0.68 y 0.85 cm) presentando diferencias significativas con los tratamientos con 100 % (v/v) de medio MS (T7, T8 y T9), ver Tabla 3.

Tabla 3. Evaluación de parámetros de desarrollo de plántulas en el día 30 de cultivo *in vitro*

Tratamiento	LE [cm] ^{o*}	NH ^{o*}	NR ^{o*}	LR ^{o*}
T1	0.41±0.032d	0.00±0.00d	2.50±0.50abcde	1.67±0.14cd
T2	0.49±0.042d	0.17±0.17cd	2.92±0.2abcd	2.67±0.14ab
T3	0.60±0.051cd	0.00±0.00d	4.25±0.37a	3.00±0.00a
T4	0.68±0.108cd	0.00±0.00d	1.67±0.22cde	1.33±0.14d
T5	0.85±0.057bc	1.50±0.42bc	2.33±0.35bcde	2.33±0.26abc
T6	1.11±0.042ab	2.17±0.27b	3.25±0.43abcd	2.83±0.11ab
T7	1.14±0.102ab	3.75±0.30a	2.67±0.35abcd	2.25±0.22bc
T8	1.24±0.043a	4.08±0.42a	3.00±0.35abcd	2.92±0.08ab
T9	1.15±0.119ab	4.42±0.34a	3.83±0.49ab	2.67±0.14ab
T10	0.74±0.056cd	2.25±0.30b	0.83±0.17e	1.00±0.21d
T11	1.31±0.042a	4.75±0.33a	1.58±0.26de	3.00±0.00a
T12	1.14±0.097ab	4.58±0.40a	3.42±0.53abc	2.58±0.15ab

^oLE.- Longitud de explante, NH.- número de hoja, NR.- número d raíz, LR.- longitud de raíz

*En la Tabla se representa la media con la desviación estándar y las diferentes letras entre columnas denotan diferencia significativa (P<0.05)

Longitud de raíz a los 30 días

Los nutrientes y la sacarosa fueron factores importantes para la longitud de la raíz, ver Tabla 3. La longitud de raíz no se vio influenciada por las distintas concentraciones de medio MS, a comparación de otro estudio [17], donde demostraron que la biomasa de raíces de 6 variedades de sauce disminuyó con la adición de fertilizante. Sin embargo, el factor que influyó negativamente en la longitud de la raíz fue la ausencia de sacarosa en el medio, como se puede observar en los tratamientos T1, T4, T7 y T10 (ver Tabla 3), los cuales presentaron los menores valores en la longitud de raíz, mientras que todos los tratamientos que contienen 1.5% y 3% de sacarosa presentaron los mayores valores en la longitud de raíz, independientemente de la concentración de medio MS empleada, se puede observar este mismo efecto en plántulas de papaya [18] en el que usaron diferentes concentraciones de sacarosa y la longitud de raíz se vio afectada al no usar sacarosa.

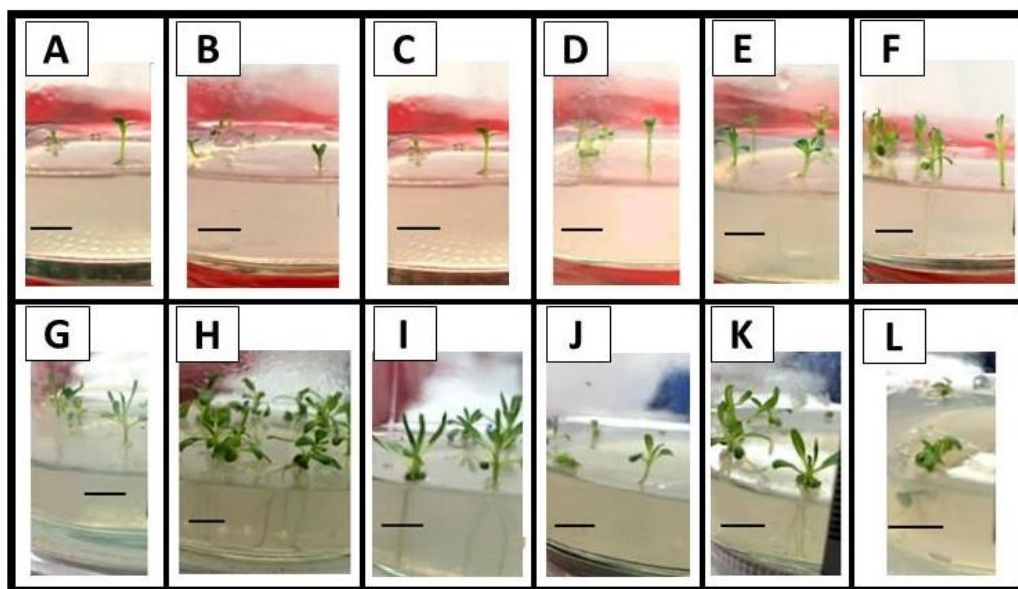


Figura 2. Desarrollo de plántulas de *Salix* a los 30 días de cultivo in vitro. A. T1.- 0 % (v/v) MS – 0 % sacarosa; B. T2.- 0 % (v/v) MS - 1.5 % (p/v) sacarosa; C. T3.- 0 % (v/v) MS – 3 % (p/v) sacarosa; D. T4.- 50 % (v/v) MS – 0 % (p/v) sacarosa; E. T5.- 50 % (v/v) MS - 1.5 % (p/v) sacarosa; F. T6.- 50 % (v/v) MS – 3 % (p/v) sacarosa; G. T7.- 100 % (v/v) MS – 0 % (p/v) sacarosa; H. T8.- 100 % (v/v) MS - 1.5 % (p/v) sacarosa; I. T9.- 100 % (v/v) MS – 3 % (p/v) sacarosa; J. T10.- 150 % (v/v) MS – 0 % (p/v) sacarosa; K. T11.- 150 % (v/v) MS - 1.5 % (p/v) sacarosa; L. T12.- 150 % (v/v) MS – 3 % (p/v) sacarosa. La escala de las barras corresponde a 0.5 mm

En cuanto a la generación de hojas es un parámetro importante para el desarrollo de la planta, en el que se está adquiriendo y asimilando de manera correcta los nutrientes, vitaminas y sacarosa, entre más sea el número de hojas en la planta, más ayudan a su desarrollo, aquellas plantas que tengan más hojas, serán plantas más estables y vigorosa. El incremento en el número de hojas se observa en los tratamientos del T5 a T12 de la Tabla 3. El promedio máximo que se obtuvo en el número de hojas fue de (4.75) en el T11, seguido de (4.58) en el T12, (4.42) en el T9, (4.08) T8 y (3.75) T7 en donde éstos no tuvieron diferencia significativa. En general se puede observar en la Figura 2 el desarrollo de las plántulas en el día 30 de cultivo en los diferentes tratamientos, observándose que los tratamientos T7, T8, T9, T11 y T12 presentan el mejor desarrollo de la plántula a partir de semilla, ver Figura 2G a la 2I y de la Figura 2K a la 2L, en el caso del tratamiento T7 a T9 el medio MS se emplea a la concentración normal empleada por Murashige y Skoog, mientras que en el tratamiento T11 y T12 se emplea una concentración de 150 % (v/v) de medio MS. Sin embargo, el empleo de concentraciones de 0 y 50 % (v/v) de medio MS (T1 a T6) aunque no afectan el porcentaje de germinación de las semillas, el desarrollo de las plántulas es muy lento (Figura 2A-F).

Trabajo a futuro

Se continuará con las evaluaciones del desarrollo de la plántula hasta el día 60 para poder determinar cuál de estos tratamientos presenta las mejores condiciones para la germinación y crecimiento de las plántulas. Se realizará la optimización de la propagación *ex vitro*, desde la etapa de multiplicación, enraizamiento y aclimatación de las plántulas, para su uso posterior en la evaluación de estrategias de inducción de respuestas de resistencia en plantas de *salix* contra *Fusarium sp* (infección por complejos ambrosiales).

Conclusiones

De los doce tratamientos que se evaluaron en este estudio, los tratamientos T8, T9 y T11 fueron los que destacaron en los parámetros de desarrollo evaluados (longitud del explante, número de hojas, número de raíces y longitud de raíz) en las plántulas *in vitro* de (*S. bonplandiana*), sugiriendo que concentraciones de 100 y 150 % de medio MS, así como la presencia de sacarosa (1.5 y 3 %) promueven un mejor desarrollo de las plantas *in vitro*.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio Nacional PLANTECC. Se agradece al CIATEJ por proveer las instalaciones necesarias para el desarrollo del proyecto y al proyecto FORDECYT 292399 financiado por CONACYT.

Referencias

- [1] J. Ball, J. Carle y A. Del Lungo, «Contribución de álamos y sauces a la silvicultura sostenible y al desarrollo rural,» 2005. [En línea]. Available: <http://www.fao.org/3/a0026s/a0026s02.htm>. [Último acceso: 01 Agosto 2020].
- [2] A. Eskalen, P. F. Rugman jones , S. Colleen Lynch, M. Twizeyimana, A. Gonzalez y T. Thibault , «Host Range of Fusarium Dieback and Its Ambrosia Beetle (Coleoptera: Scolytinae) Vector in Southern California,» *Plant Disease*, pp. 938-951, Enero 2013.
- [3] D. P. G. Short , K. O'Donnell, J. E. Stajich , J. Huler, T. Kijimoto, M. C. Berger , A. M. Macias, E. J. Spahr , C. C. Bateman, A. Eskalen, S. C. Lynch, A. I. Cognato, M. F. Cooperband y M. T. Kasson , «PCR Mutiplexes Discriminate *Fusarium* Symbionts of invasive *Euwallacea* Ambrosia Beetles that Inflict Damage n Numerous Tree Species Throughout the United States,» *Plant Disease*, vol. 101, nº 1, pp. 233-240, 2017.
- [4] D. Tripathi, G. Raikhy y D. Kumar, «Chemical elicitors of systemic acquired resistance-Salicylic acid and its functional analogs,» *Current Plant Biology*, nº 17, pp. 48-59, Marzo 2019.
- [5] R. Pierik, «Rejuvenation and micropropagation,» de *Progress in plant celular and molecular biology*, H. Nijkamp , L. Van Der Plas y J. Van Aatrijk , Edits., Dordrecht, Kluwer Academic Publisher, pp. 91-101.
- [6] D. Valero y M. de Cárcamo, «La contaminación por nutrientes,» 11 Enero 2017. [En línea]. Available: <http://fusades.org/lo-ultimo/blog/la-contaminaci%C3%B3n-por-nutrientes-nitrogeno-y-fosforo>. [Último acceso: 01 Agosto 2020].
- [7] A. E. Delgadillo López, C. A. González Ramírez, F. Prieto García, J. R. Villagómez Ibarra y O. Acevedo Sandoval, «Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación,» *SciELO*, vol. 14, nº 2, Agosto 2010.
- [8] C. S. Kunth, «*Salix bonplandiana*,» de *Nova Genera et Species Plantarum*, vol. 2, París, 1815, pp. 233-235.
- [9] M. Uribe Moraga y L. Cifuentes G., «Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación de *Legrandia coccinea*,» *BOSQUE*, vol. 1, nº 25, pp. 129-135, 26 Abril 2003.
- [10] I. M. Neyra Velasco, «Propagación *in vitro* del sauce (*Salix alba*), para uso en defensa ribereña,» Academia de Conservación de Suelos y Agua, Tingo María, 2015.

- [11] R. Paz da Silva y Á. Vilegas Monter, «Niveles de sacarosa en el enraizamiento *in vitro* y aclimatación *ex vitro* de plantulas del portainjerto de vid R110 (*vitis rupestris vitis berlandieri*),» *SciELO*, vol. 34, nº 12, Diciembre 2009.
- [12] A. Gómez Garay, B. Pintos López , J. M. Grau Corbi y Á. Bueno Pérez, «Micropropagación de *Populus tremula* L.,» *Reduca*, vol. 2, nº 7, pp. 1-11, 2014.
- [13] T. Murashige y F. Skoog, «A Revised Medium for Rapid Growth and BioAssays with *Tobacco* Tissue Cultures,» de *Physiologia Plantarum*, vol. 15, 1962, pp. 473-497.
- [14] C. Fang Qing, W. Chuan Hua y J. Guo Mei, «Ecology of *Salix variegata* seed germination,» de *Implications for species distribution and conservation in the three Geoges region*, vol. 88, 2013, pp. 243-246.
- [15] M. E. Uribe, C. Delaveau , M. Garcés y R. Escobar , «Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales,» *SciELO*, vol. 1, nº 29, pp. 58-64, 2008.
- [16] M. Andrade Rodriguez, J. Vargas Araujo, O. G. Villegas Torres, V. López Martínez, D. Guillen Sánchez y I. Alia Tejacal, «Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *cattleya (Brassolaelio cattleya) in vitro*,» *Interciencia*, vol. 40, nº 8, pp. 549-553, Agosto 2015.
- [17] R. M. Rytter, M. Weih y N. E. Nordh, «Determinants of biomass production in hybrid willows and prediction of field performace from pot studies,» *Tree Physiology*, vol. 25, pp. 1197-1206, Enero 2005.
- [18] L. Posada Pérez , Y. Padrón Montesinos, J. Gonzalez Olmedo, R. Rodriguez Sanchez, R. Barbón Rodriguez, O. Norman Montenegro, R. C. Rodríguez Escriba y R. Gómez Kosky, «Efecto del pectimorf en el enraizamiento y la aclimatación *in vitro* de brotes de papaya (*Carica papaya* L.) cultivar maradol roja,» *Cultivos tropicales*, vol. 37, nº 3, pp. 50-59, 2016.