



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE REGENERACIÓN
in vitro DE *Acacia angustissima* VÍA ORGANOGÉNESIS
INDIRECTA”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

FÉLIX EDGARDO RICO RESÉNDIZ

DIRIGIDA POR

Dr. ANDRÉS CRUZ HERNÁNDEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE
REGENERACIÓN *in vitro* DE *Acacia angustissima* VÍA
ORGANOGENESIS INDIRECTA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

FÉLIX EDGARDO RICO RESÉNDIZ

DIRIGIDA POR

Dr. ANDRÉS CRUZ HERNÁNDEZ

SINODALES

Dr. ANDRÉS CRUZ HERNÁNDEZ
DIRECTOR

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ
SINODAL

Dr. RAMÓN ALVAR MARTÍNEZ PENICHE
SINODAL

Dr. RAMÓN GERARDO GUEVARA GONZÁLEZ
SINODAL

El presente trabajo titulado “**Establecimiento de un sistema de regeneración *in vitro* de *Acacia angustissima* vía organogénesis indirecta**” fue realizado en su totalidad en el laboratorio de biología molecular localizado en la unidad de microbiología básica de la Universidad Autónoma de Querétaro campus aeropuerto bajo la dirección de **Dr. Andrés Cruz Hernández**.

Agradecimientos:

- Proyecto CONACyT ciencia básica

“Análisis molecular del nopal con énfasis en el desarrollo del fruto” clave 134953.

- Proyecto de Fondo de Fortalecimiento a la investigación a la Universidad Autónoma de Querétaro

Apropiación biotecnológica de cultivos nativos de Querétaro- Establecimiento de un sistema de cultivo de tejidos de Timbre (*Acacia angustissima*) y cempaxúchitl (*Tagetes erecta*) para su posible manipulación genética clave FIN-2012-16.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. Antecedentes	1
1.1 Cultivo de tejidos vegetales	1
1.2 Componentes del medio de cultivo	3
1.3 Fitohormonas y reguladores de crecimiento vegetal	4
1.3.1 Auxinas	6
1.3.2 Citocininas	7
1.3.3 Giberelinas	8
1.4 Vías morfogénéticas en el CTV	9
1.4.1 Organogénesis indirecta	12
1.5 Etapas de un sistema de regeneración <i>in vitro</i>	13
1.6 Aplicaciones de los sistemas de regeneración	14
1.7 Antecedentes del CTV en acacias	15
1.8 Acacias, como modelo de estudio	16
1.9 <i>Acacia angustissima</i>	17
2. Hipótesis	19
3. Objetivos	20
3.1 General	20
3.2 Específicos	20
4. Metodología	21
4.1 Desinfección y germinación de semillas	21
4.2 Selección del explante	21
4.1 Evaluación de RCV en la inducción de callo	22

4.2	Inducción de brotes	22
4.3	Rizogénesis	24
4.4	Aclimatación <i>ex vitro</i>	24
5.	Resultados	26
5.5	Desinfección y germinación de semillas	26
5.6	Selección del explante	32
5.7	Evaluación de RCV en la inducción de callo	36
5.8	Inducción de brotes	42
5.9	Rizogénesis	45
5.10	Aclimatación <i>ex vitro</i>	51
6.	Discusión	54
7.	Conclusiones	59
8.	Referencias	60
9.	Anexos	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición de medios de CTV	5
2	Concentración de RCV para inducción de callo	22
3	Concentración de RCV para inducción de brotes	23
4	Concentraciones de ANA para inducción de raíz	24
5	Condiciones de aclimatación	25
6	Resultados de desinfección y germinación <i>in vitro</i>	30
7	Resultados de selección de explante	35
8	Resultados inducción de callo	38
9	Tratamientos adicionales de CIN + 2,4-D	39
10	Resultados inducción de raíz con ANA	46
11	Cronograma de aclimatación	52
12	Resultados primer experimento de aclimatación	53
13	Resultados de aclimatación segundo experimento	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efecto del medio de cultivo en explantes y callo	11
2	Efecto de RCV en explantes	13
3	Distribución geográfica de <i>Acacia angustissima</i>	18
4	Protocolo de desinfección de semillas	29
5	Plántula de <i>Acacia angustissima in vitro</i>	31
6	Fuente de tejido vegetal y explantes	34
7	Inducción de callo con BAP + 2,4-D y CIN + 2,4-D	40
8	Callos inducidos en tratamientos 12, 16, 3 y 6	41
9	Callo en inducción de brotes	43
10	Callo sin respuesta en MIB	44
11	Efecto de inducción de callo en medio con ANA	47
12	Raíz inducida en medio MS con ANA 2.29 μM	48
13	Raíz inducida en MS libre de RCV	49
14	Comparación de tratamientos de inducción de raíz	50

RESUMEN

Los sistemas de regeneración *in vitro* posibilitan la manipulación genética, propagación de plantas seleccionadas, libres de patógenos y obtención de metabolitos secundarios. *Acacia angustissima*, es una planta leñosa, con hojas compuestas y una flor globular. Con alto contenido de proteína, fibra y taninos condensados. Es utilizada en la medicina tradicional para tratar diarrea y dolor de garganta. El objetivo de este trabajo es establecer las condiciones de un sistema de regeneración vía organogénesis indirecta. Se estableció un protocolo de desinfección y germinación de semillas, teniendo como resultado plántulas juveniles. Estas se utilizaron como fuente de tejido vegetal, en la evaluación de 5 tejidos como explante, mostrando que el cotiledón presenta la mejor respuesta. Se evaluó la inducción del callo utilizando medio MS con BAP + 2,4-D y CIN + 2,4-D a diferentes concentraciones, determinando que CIN (2.32 μM) + 2.4-D (9.04 μM) mostraban el mayor porcentaje de inducción. Para la inducción de brotes se probaron diferentes concentraciones de BAP + ANA, sin embargo, no se logró la formación de brotes bajo estas condiciones. Evaluamos también la inducción de raíz en un medio suplementado con ANA a diferentes concentraciones, donde el medio libre de auxinas mostro el mejor resultado. Finalmente se logró una tasa de 45% de sobrevivencia en la adaptación de plántulas de condiciones *in vitro* a *ex vitro*. Hasta el momento se han establecido las condiciones del sistema de regeneración *in vitro* vía organogénesis indirecta para *Acacia angustissima*. Generando así una herramienta que permitirá el aprovechamiento de las características de esta planta.

1. Antecedentes

1.1 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) se puede definir como el cultivo aséptico de células, tejidos y órganos bajo condiciones físicas y químicas definidas *in vitro*. Esta una tecnología explora las condiciones que promueve la división celular y la reprogramación genética en condiciones *in vitro*, por efecto de los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) (Loyola Vargas y Vázquez Flota, 2006). Las bases teóricas del CTV fueron propuestas por Gottlieb Haberland, científico alemán, que en 1902 acuñó el concepto de totipotencialidad celular, sugiriendo que las células vegetales tiene la información necesaria como unidad fundamental, para regenerar un organismo completo. Sus experimentos con células fotosintéticas de hoja y otros tejidos diferenciados, no le permitieron probar su teoría, sin embargo predijo que se podían obtener embriones a partir de células somáticas vegetales. El primer cultivo de tejidos en plantas lo hizo Gautheret en *Hacer pseudoplatanus* con medio Knop's, glucosa, cisteína y agar. Posteriormente la incorporación del ácido indolacético (AIA) y vitaminas B permitieron el cultivo en zanahoria. Estudios realizados por Skoog mostraron que la adición de adenina y altos niveles de fosfato permitió el cultivo de tejidos no meristemáticos induciendo la formación de brotes y raíces, solo en presencia de tejido vascular, esta observación se realizó al adicionar esperma de pez al medio. La regulación de la morfogénesis fue descrita por Miller y Skoog, estableciendo que está regulada por la concentración de auxinas y citocininas en el medio. En cuanto a la formulación de los primeros medios nutritivos fue variada, los más utilizados fueron la solución Knop's, Uspensky y Uspenskia, que proveían aproximadamente 200 mg/L de sales totales. No fue hasta 1962 que se presentó uno de desarrollos más importantes en el cultivo de tejidos vegetales, se desarrolló de un nuevo medio de cultivo por Murashige y Skoog, que mostraba un contenido de sales totales era 25 veces más que el medio Knop's, en particular los niveles de NO_3 y NH_4 mostraban concentraciones muy altas. El medio MS, como fue nombrado, es actualmente el medio más utilizado en el cultivo de tejidos vegetales

(Thorpe, 2007). Entre 1940 y 1969 se probaron estrategias para mejorar el CTV *in vitro*, la formulación del medio MS por Murashige y Skoog, la incorporación del agua de coco en el medio, la adición de adenina, el descubrimiento de la Cinetina por Skoog y la regulación química del crecimiento y formación de brotes en cultivos *in vitro* propuesta por Skoog y Miller se conjuntaron incrementando la cantidad de plantas que podían someterse a CTV; esto permitió a Albert C. Hildebrandt comprobar la totipotencialidad celular al regenerar una planta de tabaco a partir de una célula aislada (Vasil, 2008).

Los avances en el CTV y la biología molecular permiten la manipulación genética de plantas, a través de la inserción de genes foráneos de diversos sistemas biológicos, a esta tecnología se le ha llamado ingeniería genética. Donde la regeneración de plantas *in vitro* juega un rol muy importante ya que para modificar una planta esta debe poder ser regenerada. Durante la década de los 90's continuo la expansión de regeneración vegetal *in vitro* para incrementar el número de plantas con sistema de regeneración. Estas técnicas han sido utilizadas en muchos tipos de plantas incluyendo cereales, leguminosas, vegetales, frutas tropicales, plantas leñosas, medicinales y ornamentales.

Las técnicas cultivo de tejidos puede clasificarse de manera general en tres grandes grupos:

- a) Micropropagación
- b) Embriogénesis somática
- c) Organogénesis

La propagación clonal de cualquier planta se conoce como micropropagación, esta se puede llevar a cabo por tres vías, al inducir el desarrollo de las yemas axilares, por la inducción directa o indirecta la formación de órganos *de novo* y la formación de embriones somáticos directa o indirectamente a partir de un explante. La organogénesis involucra el desarrollo de órganos *de novo*, de manera directa a inducirlos de explante e indirectamente cuando la inducción de órganos se hace a

partir de un estadio intermedio llamado callo. La embriogénesis somática es la obtención de embriones a partir de células somáticas, esta inducción al igual que la organogénesis puede ser directa o indirecta. Se ha demostrado que las dos principales rutas utilizadas para la regeneración *in vitro* de plantas son la organogénesis *de novo* y la embriogénesis somática, ambas dependen de la relación de fitohormonas, división célula, desdiferenciación para adquirir capacidad organogénica, de iniciación de órganos y desarrollo (Duclercq y col., 2011).

1.2 Componentes del medio de cultivo

En el cultivo de tejidos vegetales se han empleado una gran variedad de soluciones nutritivas en busca de un medio que permita el cultivo de células vegetales. Inicialmente se empleaban medios simples como Knop's donde se presentaba una baja concentración de sales disponibles. Estos medios simples eran suplementados con una gran variedad de sustancias por ejemplo proteínas hidrolizadas, extracto de levadura, jugo de papa, y extractos de la plantas sometidas al cultivo. Se creía que los extractos aportaban los nutrientes necesarios para el desarrollo de la planta.

Los medios artificiales, que involucran nutrientes los necesarios para el crecimiento y desarrollo de una planta están compuestos por macronutrientes, micronutrientes y vitaminas. Los elementos que son requeridos en grandes cantidades son llamados macronutrientes, son iones de nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg) y azufre (S). Por otra parte los elementos que son requeridos en cantidades menores son llamados micronutrientes o nutrientes traza hierro (Fe), níquel (Ni), cloro (Cl), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu) y molibdeno (Mo). Para considerar un elemento como esencial en el crecimiento de las plantas debe tener una función específica que no pueda ser remplazada completamente por otros elementos, este efecto debe ser directo, no influenciado por el medio ambiente y finalmente si se retira del medio de cultivo la planta no podrá llevar a cabo su ciclo de vida. El medio comúnmente utilizado es la formulación de

Murashige y Skoog (1962), que fue desarrollado para el crecimiento óptimo de callos de tabaco, este medio presentaba una concentración 25 veces más alta que los medios empleados como el Knop's, principalmente en el contenido de nitrógeno, destacando la adición de extracto de plantas de tabaco, que se pensaba tenía los componentes necesarios para que se desarrolle esta planta. Estos medios no solo proveen de compuestos inorgánicos, también se incluyen orgánicos como carbohidratos, vitaminas y reguladores de crecimiento. La sacarosa como fuente de carbono se emplea entre 2 y 5 % generalmente, aunque en algunos casos se emplea glucosa e inositol. Mientras que los reguladores de crecimiento vegetal se incorporan de 1 a 10 μM , a pesar de que en las plantas son activos a concentraciones nanomolares. La incorporación de componentes no definidos como agua de coco, pulpa de plátano, jugo de jitomate, extracto de levadura y proteínas hidrolizadas se emplea comúnmente con plantas recalcitrantes. La solidificación del medio es otro aspecto importante, se utiliza agar bacteriano 8 g/L o phytigel 3 g/L. Actualmente los medios más utilizados son el MS, el B5 o Gamborg y White, la comparación entre estos medios puede observarse en el Cuadro 1, donde se muestran las diferencias entre el contenido de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas. (George y col., 2008).

1.3 Fitohormonas y reguladores de crecimiento vegetal

Se ha detectado la presencia de algunas sustancias químicas importantes, encontradas de manera natural en los tejidos vegetales, poseen un papel regulador en el desarrollo, crecimiento y nutrición de las plantas. Son generalmente activos a concentraciones muy bajas y conocidos como hormonas vegetales o fitohormonas. Por otro lado se descubrieron químicos sintéticos que promueven actividades fisiológicas similares, a los que se les denominó reguladores de crecimiento vegetal. Estas sustancias tienen una actividad biológica igual o superior que las sustancias naturales equivalentes.

Cuadro 1. Composición de medios de cultivo de CTV (George y col., 2008).

Componentes	MS (mg/L)	B5 (mg/L)	White (mg/g)
Cu₄.5H₂O	0.025	0.13	0.025
MgSO₄.7H₂O	370	731	370
MnSO₄.4H₂O	22.3	-----	22.3
ZnSO₄.7H₂O	8.6	2.65	8.6
KNO₃	1900	80	950
NH₄NO₃	1650	-----	82.5
Ca(NO₃)₂.4H₂O	-----	288	-----
KCl	-----	65	-----
CaCl₂.2H₂O	440	-----	440
CoCl₂	0.025	-----	0.025
MnCl₂.4H₂O	-----	6	-----
KH₂PO₄	170	4.8	5
NaFeEDTA	-----	8	-----
Na₂EDTA	37.25	-----	37.25
FeSO₄.7H₂O	27.8	-----	27.8
KI	0.83	0.75	0.4
H₂BO₃	6.2	1.5	6.2
Na₂MoO₄.2H₂O	0.25	0.0024	0.24
Sacarosa	30000	10000	20000
Glicina	2	3	3
Tiamina hidrociorada	0.1	0.1	0.1
Piridoxina hidrociorada	0.1	0.1	0.1
Ácido nicotínico	0.5	0.5	0.5
Myo inositol	100	50	50
Agar	10000	10000	2000

Hay varias clases reconocidas de hormonas vegetales, los cinco principales grupos son:

- Auxinas
- Citocininas
- Giberelinas
- Etileno
- Ácido absísico

En la última década se ha hecho evidente que no solo existen cinco hormonas vegetales, se han descubierto otras como brasinoesteroides, ácido jasmónico que ya están bien caracterizadas. A continuación describiremos de manera detallada las auxinas, citocininas y giberelinas (George y col., 2008).

1.3.1 Auxinas

Esta hormona vegetal juega un papel crucial en la regulación del desarrollo, incluyendo desarrollo embrionario, radicular, formación de órganos, diferenciación de tejido vascular y crecimiento en respuesta a estímulos ambientales. De manera natural se encuentra principalmente como ácido indol acético (AIA), aunque en algunas especies se encuentra como ácido indol butírico (AIB) o como ácido cloro indol acético (4-Cl-AIA), los análogos sintéticos como ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) son metabólicamente más estables por lo que son ampliamente utilizadas en estudios biológicos y en la agricultura. Es sintetizado en el tejido joven por medio de dos vías, una a partir del triptófano y otra utilizando como sustrato el indol-glicerol fosfato. La distribución al resto de los tejidos se da a través del floema e involucra un sistema de transporte célula-célula. (Vieta y col., 2007). En adición al medio de cultivo las auxinas pueden ser inactivadas o almacenadas a través de la conjugación con aminoácidos, azúcares y péptidos. Estas sustancias regulan procesos de desarrollo tales como

organogénesis, embriogénesis, patrones de tejido, dominancia apical y tropismos, a través de la acumulación o agotamiento de la concentración de auxinas en un grupo de células conocido como auxinmaxima o bien como un gradiente que juega un papel importante en el patrón de regulación de estos procesos (Vanneste y Friml, 2009). En el cultivo de tejidos se emplean para promover en combinación con las citocininas la formación de callo y la inducción de raíces adventicias. Estas sustancias se adicionan al medio de cultivo para promover la división y alargamiento celular. Se ha establecido que si la concentración de auxinas es aproximadamente igual a la concentración de citocininas se promueve la formación de callo, mientras que medios de cultivo suplementados únicamente con auxinas promueven la formación de raíces.

1.3.2 Citocininas

Son una clase de fitohormonas que regulan una amplia variedad de procesos fisiológicos y de desarrollo, tal como la regulación del crecimiento de brotes y raíces. Controlan la tasa de diferenciación celular durante el desarrollo del meristemo radicular mediante la supresión del transporte y señalización de las auxinas; este proceso antagonista también se observa en la emergencia y la iniciación de la hoja. Las Citocininas son un grupo de fitohormonas descubiertas originalmente como factores de promoción de la división celular en el cultivo *in vitro* de tabaco. Desde su descubrimiento estos N6-sustituidos derivados de adenina se ha demostrado que se encuentran involucrados en varios procesos de desarrollo y el crecimiento, incluyendo germinación, desarrollo del brote, raíz, nodulación y regulación de ritmos circadianos (Perilli y col., 2010). En el cultivo de células vegetales se utilizan para promover la formación de brotes, la formación de embriones.

1.3.3 Giberelinas

Pertenecen a un grupo de fitohormonas, donde actualmente se conocen más de 100 sustancias. Se han encontrado principalmente en hongos y en plantas superiores, principalmente AG₁ es la giberelina que presenta una mayor actividad de elongación, mientras que la giberelina comúnmente disponibles es la AG₃. Estas sustancias están involucradas en procesos de desarrollo, como la promoción y elongación de tallos y hojas. Por otra parte se promueve la inducción de enzimas hidrolíticas como α -amilasas y proteasas, en semillas, pastos y cereales. También participa en la germinación de semillas, determinación del sexo, desarrollo del fruto y el control del estado juvenil. El cultivo de tejidos generalmente se emplea AG₃ adicionada en el medio , en altas concentraciones alrededor de 5 μ M o de 1 a 8 mg/L se promueve el crecimiento de células desdiferenciadas en callo, puede promover el desarrollo de callo en combinación con auxinas y bajas concentraciones de citocininas. En cultivos celulares en suspensión incrementa el crecimiento de las células. La adición de AG₃ en un medio inductor de brotes con auxinas y citocininas inhibe la formación de brotes, sin embargo, en algunas plantas como *Apios americana* promueve la formación de brotes al adicionar auxinas al medio. Adicionando AG₃ y citocininas se incrementa la producción de brotes. La inhibición o formación de brotes mediada por AG₃ en el medio, depende de la naturaleza y duración de los tratamientos influyen de manera directa los resultados obtenidos. Por otro lado la inhibición de formación de raíz se promueve con altas concentraciones de AG₃ alrededor de 10 mg/L. pero se ha observado que si se adiciona con una baja concentración de auxinas se promueve la formación de raíces debido a que el AG₃ promueve la síntesis de auxinas; por lo que si la concentración de auxinas adicionadas al medio es alta la concentración, esta concentración se incrementara y se provoca la inhibición de formación de raíz por exceso de auxina en el medio (Moshkov y col.,2008)

1.4 Vías morfogénicas en el CTV

Las vías morfogénicas en el cultivo de tejidos vegetales son embriogénesis somática y organogénesis *de novo*, son vías independientes y mutuamente excluyentes reguladas por la concentración de auxinas y citocininas en el medio de cultivo. Se han reconocido dos procesos de diferenciación *in vitro* que ocurren en la naturaleza: organogénesis y embriogénesis somática. Son resultado de diferentes procesos de desarrollo, de tal forma que las células pueden ser dirigidas solo a una de las dos vías. La embriogénesis somática es el proceso mediante el cual se forman embriones a partir de células que no son producto de la fusión de dos gametos. Los embriones somáticos, asexuales o adventicios son estructuras bipolares con un eje radical-apical, y no poseen conexión vascular con el tejido materno, las estructuras bipolares deben también ser capaces de crecer y formar plantas normales. Este es un evento morfológico que ocurre *in vivo* a partir de células nucleadas en algunas especies de plantas, por ejemplo, *Citrus spp.*, *Mangifera indica*, *Eugenia spp.*, *Garcinia mangostana* y *Lansium domesticum*. La embriogénesis somática puede distinguirse de la organogénesis en tres características esenciales. La primera es que se deriva típicamente de una célula y pasa por los estadios globular, corazón, torpedo y cotiledonario; el embrión resultante es una estructura bipolar que posee los meristemos apical y radicular definidos. Por otro lado, la organogénesis forma meristemos apicales o radiculares con el subsecuente desarrollo de hojas verdaderas asociadas al meristemo apical o raíces asociadas al meristemo radicular. El desarrollo de la embriogénesis involucra una serie de eventos organizados que incluyen la inducción, el crecimiento primario, la maduración de los embriones y la germinación. La primera etapa de desarrollo, llamada inducción la célula adquieren forma globular, con células isodiamétricas, esencialmente desdiferenciadas donde se hacen presentes primordios meristemáticos y hay una vacuolación intensiva. En la segunda etapa o de crecimiento primario, ocurre la mayor parte de los procesos de diferenciación, inicialmente se pueden reconocer los meristemos apical y radicular, con forma acorazonada típica. Más adelante la intensiva división celular lleva a la formación

de torpedo donde la célula es más larga y adelgazada; aquí ya pueden identificarse los meristemas. En la etapa de maduración del embrión ocurre una serie de eventos terminales, se forma la yema apical visible y aparece el domo apical, cesa la actividad mitótica, se acumulan carbohidratos de reserva, lípidos y proteínas; disminuye el contenido de agua. Las células del embrión son de menor tamaño de que las de la planta que formarán y presentan muy poca actividad metabólica. Finalmente, la germinación de los embriones ocurre primeramente con una imbibición de agua, iniciándose el proceso de división celular, así como el crecimiento de las mismas; los cotiledones se expanden, se desarrolla el primordio foliar, el hipocotilo se expande y la raíz primaria crece. La naturaleza independiente de los embriones somáticos, genera algunas ventajas para la manipulación del sistema de embriogénesis somática:

- Se pueden producir grandes cantidades de embriones somáticos.
- Se puede escalar fácilmente un sistema de producción en un cultivo en suspensión.
- Se puede manipular de forma independiente los embriones producidos, pues presentan una autonomía con respecto al tejido madre.
- Se puede inducir latencia en los embriones somáticos maduros.
- Se puede encapsular para ser utilizados como semillas sintéticas

La obtención de embriones a partir de células somáticas es conocida como embriogénesis somática, esta vía morfogénica puede ser inducida de manera directa al obtener los embriones a partir de los explantes o de manera indirecta induciendo la proliferación de células desdiferenciadas, donde posteriormente originan una estructura amorfa de células llamada callo, donde posteriormente se originan los embriones somáticos. El término organogénesis *de novo* en el cultivo de tejidos vegetales en contraste con la embriogénesis somática, comprende el

desarrollo de yemas o meristemas a partir de explantes. El proceso puede ocurrir de manera indirecta; cuando los órganos son regenerados a partir de células desdiferenciadas o de manera directa induciendo el meristemo apical y radicular es inducido directamente del explante. Este método de cultivo de tejidos vegetales ha permitido la propagación comercial de plantas de interés económico (George y col., 2008).

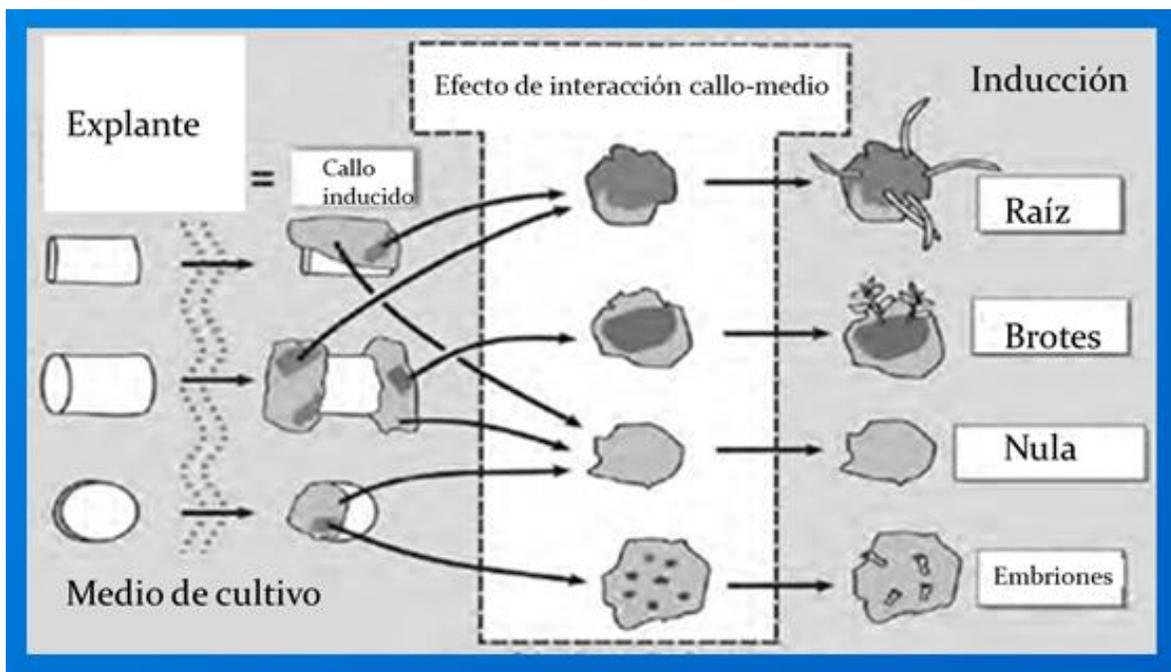


Figura 1. Efecto del medio de cultivo en explantes y callo (George y col., 2008).

Estas vías morfogénicas son controladas por la concentración de auxinas y citocininas en el medio de cultivo, de manera que cuando un explante interactúa con el medio se inducen diversas respuestas como se puede observar en la Figura 1 donde se puede observar la formación de callo, embriones, brotes, raíz y puede no presentar ninguna respuesta (George y col., 2008). De esta manera observamos que el tejido que es utilizado como explante se coloca en contacto con el medio de

cultivo, este esta suplementado con RCV y de acuerdo al balance de estos se presenta la respuesta. De acuerdo a lo reportado por Miller y Skoog para obtener la formación de callo se emplea una concentración equivalente de auxinas y citocininas, sin embargo, la presencia de concentraciones elevadas de auxinas promueve la formación de callo. Por otro lado si utilizamos una mayor concentración de auxinas en el medio de cultivo promovemos la formación de raíces en el callo como se puede observar en la Figura 1. De manera contraria si la concentración de citocininas es más elevada se promueve la formación de brotes. Para llevar a cabo la inducción de embriones somáticos es necesario retirar las auxinas por completo del medio de cultivo, una vez hecho esto se promueve los estadios globular, corazón, torpedo y de cotiledón en los embriones. A pesar de esto en ocasiones existe la posibilidad de que no se presente respuesta en el callo.

1.4.1 Organogénesis indirecta

Es la regeneración *in vitro* de plantas completas a partir de células somáticas totipotentes. Refiriéndonos estrictamente al proceso que inicia la formación de órganos *de novo* a partir de células desdiferenciadas en la fase de callo. La caracterización morfológica, fisiológica y genética de esta vía de regeneración presenta tres fases: adquisición de competencia, canalización y morfogénesis. En la primera etapa las células que se encuentran en el explante adquieren la habilidad o competencia como respuesta inducida por la concentración de hormonas, este proceso de adquirir competencia organogénica es conocido como desdiferenciación. En la segunda fase las células son canalizadas y determinadas para la formación de un órgano específico bajo la influencia del balance hormonal del medio de cultivo. La fase de morfogénesis es independiente de las fitohormonas suplementadas durante esta y culmina con la formación de los órganos *de novo* (Sugiyama, 1999). La Figura 2 muestra los efectos de las diferentes interacciones de concentraciones entre auxinas y citocininas. Donde podemos observar como efecto la formación de raíz, inducción de callo en monocotiledóneas, 1° etapa de

embriogénesis somática, inducción de raíz en callo, inducción de callo en dicotiledóneas, inducción de brotes y proliferación de brotes axilares como un efecto de la relación de auxinas y citocininas respectivamente.

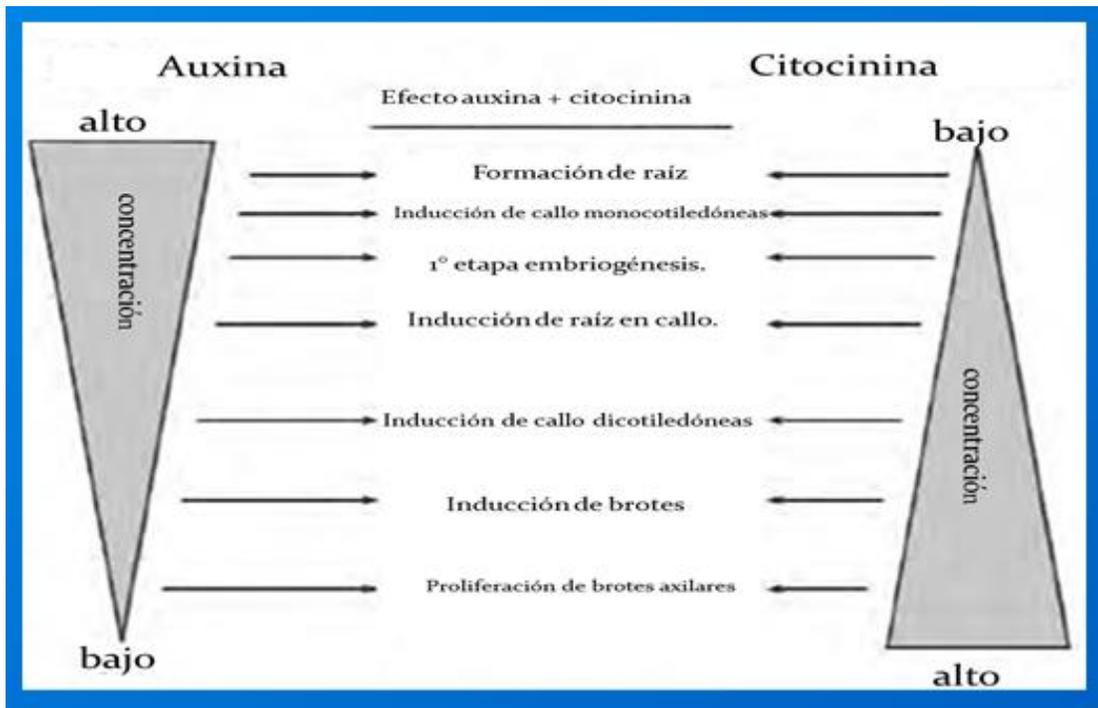


Figura 2. Efecto de RCV en explante (George y col., 2008).

1.5 Etapas de un sistema de regeneración *in vitro*

Un sistema de regeneración *in vitro* vía organogénesis indirecta presenta 7 etapas. La primera es el establecimiento de la fuente de tejido vegetal, en esta etapa se selecciona el tejido para iniciar los cultivos celulares. Una de las estrategias comúnmente utilizada es la germinación *in vitro* de semillas para obtener material vegetal juvenil, este presenta una mayor plasticidad y facilita la inducción de células desdiferenciadas. Sin embargo, no todas las plantas se pueden someter a este proceso debido a que tiene una baja tasa de germinación o es difícil obtener la

semilla, en estos se toman partes de tejido vegetal como los meristemos, embriones inmaduros entre otros. El segundo paso es el establecimiento de un protocolo de desinfección del material vegetal, generalmente se emplean soluciones de hipoclorito de sodio que van de 1 % a 5 % (v/v) con tween 20 como agente surfactante, cloruro de mercurio, etanol absoluto y etanol 70%. Como tercera etapa tenemos la obtención de células desdiferenciadas, estas son obtenidas en un medio inductor de callo (MIC) que generalmente presenta una concentración equitativa de auxinas con respecto a la concentración de citocininas. La cuarta etapa involucra la formación brotes a través de un medio inductor de brotes (MIB) en el que la concentración de citocininas es más alta con respecto a la concentración de auxinas. La quinta etapa es la elongación de los brotes, esta se logra adicionando AG₃ al medio de cultivo. La sexta etapa es la inducción de raíces para la cual se utilizan medio suplementados con auxinas. Finalmente el séptimo paso es la adaptación a las condiciones *ex vitro* donde se busca establecer un cambio gradual que le permita a la planta sobrevivir, ya que esta al estar en condiciones *in vitro* presenta poca tolerancia al intercambio gaseoso, una cutícula muy delgada, alta transpiración, tasa fotosintética baja entre otras deficiencias.

1.6 Aplicaciones de los sistemas de regeneración

Los sistemas de regeneración a través del cultivo de tejidos representan un grupo poderoso de técnicas, con múltiples aplicaciones a diversos niveles. Son empleados para regenerar plantas que presentan problemas de propagación, como es el caso de las orquídeas, cetáceas, etc. También se emplean en la obtención clonal de plantas elite con características industriales importantes, por ejemplo la obtención clones de *agave tequilan* por organogénesis *de novo*, permite obtener una gran cantidad de plantas con características homogéneas. Por otro lado la obtención de variedades resistentes a estrés, biótico y abiótico, a través del mejoramiento genético en medios selectivos, permiten regenerar plantas resistentes. La obtención de plantas libres de patógenos a través del cultivo de

semilla, en estos se toman partes de tejido vegetal como los meristemos, embriones inmaduros entre otros. El segundo paso es el establecimiento de un protocolo de desinfección del material vegetal, generalmente se emplean soluciones de hipoclorito de sodio que van de 1 % a 5 % (v/v) con tween 20 como agente surfactante, cloruro de mercurio, etanol absoluto y etanol 70%. Como tercera etapa tenemos la obtención de células desdiferenciadas, estas son obtenidas en un medio inductor de callo (MIC) que generalmente presenta una concentración equitativa de auxinas con respecto a la concentración de citocininas. La cuarta etapa involucra la formación brotes a través de un medio inductor de brotes (MIB) en el que la concentración de citocininas es más alta con respecto a la concentración de auxinas. La quinta etapa es la elongación de los brotes, esta se logra adicionando AG₃ al medio de cultivo. La sexta etapa es la inducción de raíces para la cual se utilizan medio suplementados con auxinas. Finalmente el séptimo paso es la adaptación a las condiciones *ex vitro* donde se busca establecer un cambio gradual que le permita a la planta sobrevivir, ya que esta al estar en condiciones *in vitro* presenta poca tolerancia al intercambio gaseoso, una cutícula muy delgada, alta transpiración, tasa fotosintética baja entre otras deficiencias.

1.6 Aplicaciones de los sistemas de regeneración

Los sistemas de regeneración a través del cultivo de tejidos representan un grupo poderoso de técnicas, con múltiples aplicaciones a diversos niveles. Son empleados para regenerar plantas que presentan problemas de propagación, como es el caso de las orquídeas, cetáceas, etc. También se emplean en la obtención clonal de plantas elite con características industriales importantes, por ejemplo la obtención clones de *agave tequilan* por organogénesis *de novo*, permite obtener una gran cantidad de plantas con características homogéneas. Por otro lado la obtención de variedades resistentes a estrés, biótico y abiótico, a través del mejoramiento genético en medios selectivos, permiten regenerar plantas resistentes. La obtención de plantas libres de patógenos a través del cultivo de

meritemos, ha mostrado buenos resultados regenerando plantas libres de enfermedades ayudando a mitigar enfermedades, como la del virus de la tristeza en los cítricos. Los cultivos celulares se emplean en la producción de metabolitos secundarios de interés a través de su cultivo en bioreactores. Sin embargo, la aproximación más importante es la regeneración de plantas modificadas genéticamente, ya que sin un sistema de regeneración no existiría la posibilidad de llevar a cabo la transgénesis.

1.7 Antecedentes del CTV en acacias

Las especies leñosas, como es el caso de las acacias, están consideradas como especies recalcitrantes al cultivo de tejidos. Sin embargo, se ha realizado exhaustivas investigaciones en varias especies de *Acacia* utilizando diferentes explantes. Por ejemplo puntas de yemas en *A. koa*, cotiledón en *A. albida*, brotes de plantas adultas en *A. catechu*, *A. ligulata*, y *A. mangium*, cultivos celulares en *A. senegal*, hipocotilo, yemas axilares y punta de brotes en *A. auriculiformis*, brotes juveniles de *A. melanoxylon*, hipocotilo y brotes juveniles de *A. mearnsii* (Beck y Dunlop, 2001). Se estableció un sistema de regeneración para *A. sinuata* mediante organogénesis indirecta, los cultivos de callos se derivaron de hipocotilo en medio MS con 3% de sacarosa, 08% de agar y suplementado con 2,4-D (6.78 μM) + BAP (2.22 μM). La regeneración de brotes se obtuvo con medio MS suplementado con 10% de agua de coco, BAP (13.2 μM) + AIA (3.42 μM). La elongación se favorece adicionando AG₃ (1.73 μM). El enraizamiento se obtuvo con medio MS suplementado con AIB (7.36 μM). Se reporta un rendimiento de hasta 20 plantas por hipocotilo en un periodo de cuatro meses (Vengadesan y col, 2000).

1.8 Acacias, como modelo de estudio

Las acacias son árboles leñosos, presentan hojas compuestas y una flor globular. Tienen una amplia zona de distribución geográfica, en regiones de clima tropical y subtropical de Australia, América del sur, África y Asia. Se consideran componentes importantes de la vegetación nativa con importancia económica y ecológica (Dewan, 1992). La propagación de manera natural en estas especies se da por semilla, es muy lenta; debido a la muerte de plántulas jóvenes en su hábitat natural. Debido a que la producción de combustible a partir de la madera de estas especies es de aproximadamente 1200 millones de metros cúbicos de acuerdo a (Arnold y Jongma; 1978). Debido a las características generales de la especie son utilizadas como modelos en la reforestación de los suelos ya que evitan la erosión causada por el viento y las precipitaciones (Dzowela, 1994). La fijación de nitrógeno es una característica importante de este grupo de especies, ya que poseen raíces profundas donde se lleva a cabo una simbiosis con bacterias y hongos fijadores de nitrógeno (Dzowela, 1998). Son usadas comúnmente para la producción de madera, combustible y en algunos casos como forraje para animales entre otras (Hove y col.; 2001). El cultivo de tejidos vegetal es una herramienta utilizada que juega un papel importante en los programas de mejoramiento de árboles con respecto a la eficiencia y calidad de los árboles que se producen (Beck y Dunlop, 2001). Recientemente se reportó un sistema de regeneración por organogénesis directa para *A. mangium* derivado de explantes obtenidos de semillas germinadas. Los brotes se obtuvieron en medio MS suplementado con BAP (4 μ M), mientras que el enraizamiento se logró utilizando medio MS suplementados con AIB (8.0 μ M). Se reporta un porcentaje de aclimatación del 65% en condiciones *ex vitro* (Shahinozzaman y col., 2012)

1.9 *Acacia angustissima*

Pertenece a la familia *Fabacea* subfamilia *Mimosoidae*. *Acacia angustissima* (Miller) Kuntze es conocida también como timbe, timbre o palo de pulque. Esta especie crece en los bosques caducifolios y matorral espinoso entre los 1400 y 2600 m de altitud, en suelos someros, calizos, arenosos, pedregosos y bien drenados. Tolerancia a suelos ácidos, sequías y heladas. Se le puede encontrar como árbol o arbusto con hojas alternas compuestas y flores blancas pequeñas en cabezuelas globosa, el fruto es vaina o legumbre aplanada de 3.5 a 8 cm de largo con semillas de 0.3 cm (SEMARNAT, 2003; Martínez, 1994). Debido a estas características podemos encontrarla distribuida a lo largo de todo el país (Orwa y col., 2009). En comunidades rurales donde se encuentra distribuida su madera es utilizada en la construcción de viviendas, herramientas agrícolas, cercos y combustible. En zonas de Guanajuato el fruto de la vaina es aplicado para inducir la fermentación del pulque. La corteza se recomienda para el tratamiento de diarrea y reumatismo; la raíz es masticada o tomada en infusión para reducir el dolor de garganta y afianzar la dentadura, también fue aplicada en la industria de la curtiembre, actualmente se comercializa en otros países y México la compra con un 10 % de arancel por importación, mientras que la demanda de taninos vegetales en la industria local sigue creciendo (Adame y Adame, 2000). La Figura 3 muestra la distribución geográfica de *Acacia angustissima* en el mundo, se puede observar el territorio donde se considera una especie nativa y exótica.

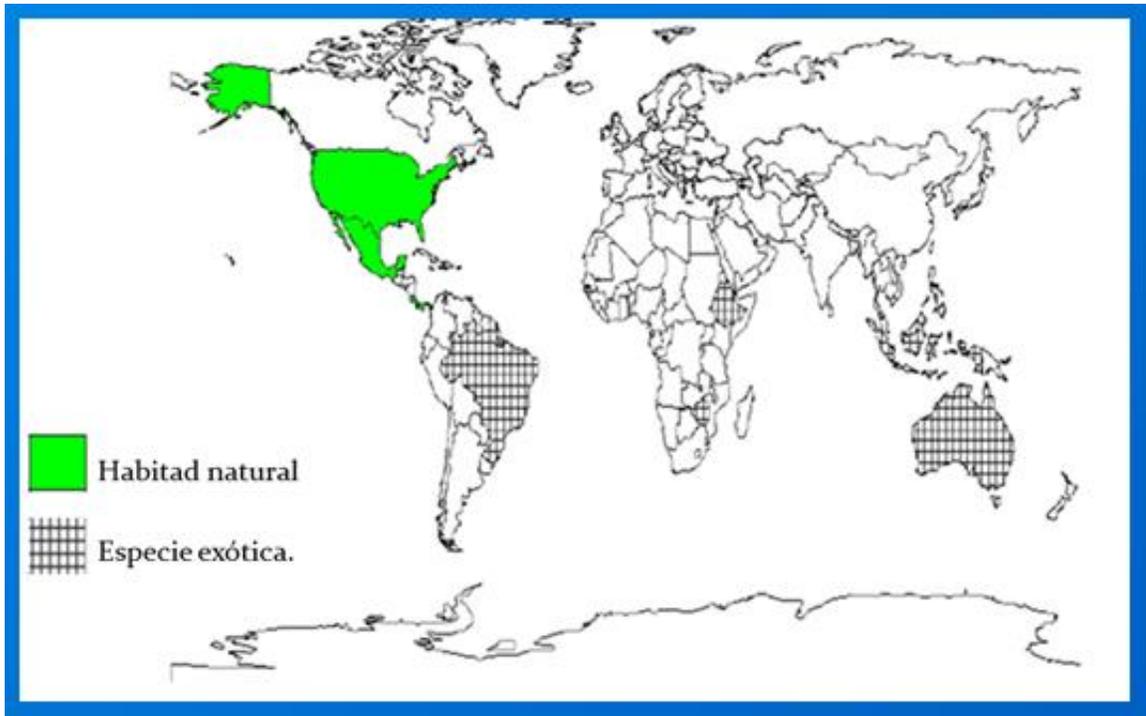


Figura 3. Distribución geográfica de *Acacia angustissima*.

2. Hipótesis

“Es posible establecer un sistema de regeneración vía organogénesis indirecta para *Acacia angustissima*, que permitirá el aprovechamiento de las características de interés de esta planta nativa”

3. Objetivos

3.1 General

- Establecer las condiciones de un sistema de regeneración *in vitro* para *Acacia Angustissima* vía organogénesis indirecta.

3.2 Específicos

- Establecer un protocolo para desinfestación de semillas de *Acacia Angustissima*, que mantenga la asepsia durante el cultivo.
- Seleccionar el tejido vegetal que presente la mejor respuesta de inducción de callo, para ser utilizado como explante.
- Evaluar la adición de RCV al medio MS para determinar la combinación y concentración a la que se obtienen callos friables.
- Determinar las condiciones a las cuales se obtiene la mayor cantidad de brotes evaluando diferentes tratamientos de RCV en medio MS.
- Establecer las condiciones para la inducción de raíz utilizando medio MS suplementado con RCV.
- Determinar un protocolo de aclimatación de cultivo *in vitro* a condiciones *ex vitro* que nos permita tener un mayor porcentaje de sobrevivencia.

4. Metodología

4.1 Desinfección y germinación de semillas

La desinfección de semillas de *Acacia angustissima* se realizó de acuerdo al siguiente protocolo, primero se hizo un escarificado con ácido sulfúrico concentrado durante 5 minutos, concluido este tiempo se realizó un lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 2 % (v/v) con tween 20 como surfactante por 20 minutos, posteriormente dos lavados con alcohol absoluto y al 70 % (v/v) durante 15 minutos respectivamente; entre cada lavado se enjuago con agua destilada estéril. Finalmente las semillas se colocaron en una caja de petri con papel filtro estéril. Las semillas desinfectadas fueron inoculadas en medio MS con 3 % de sacarosa (m/v), 0.3 % de phytigel (m/v), pH 5.8 y esterilizados por presión en autoclave a 15 psi. El proceso se llevó a cabo en la campana de flujo laminar para evitar contaminación y mantener la asepsia durante el cultivo. Los frascos se colocaron a temperatura ambiente y fotoperiodo natural.

4.2 Selección del explante

Plántulas de 20 días se utilizaron como fuente de explante tomando fracciones de 5 mm aproximadamente. En este trabajo utilizamos nodo, hoja, epicotilo, hipocotilo y cotiledón que se colocaron en cajas de petri con medio MS con 3 % de sacarosa (m/v), 0.3 % de phytigel (m/v), a un pH de 5.8, esterilizado por presión en autoclave a 15 psi y suplemento con BAP (2.22 μ M) + 2,4-D (6.78 μ M). Las cajas de petri se colocaron a temperatura ambiente y oscuridad. Se evaluó el porcentaje de inducción de callo y se comparó la respuesta con respecto al tiempo, para determinar el explante que presentaba la mejor respuesta.

4.1 Evaluación de RCV en la inducción de callo.

Plántulas de 20 días de edad se utilizaron como fuente de explante tomando fracciones de 5 mm aproximadamente, los explantes se colocaron en cajas de petri con medio MS con 3 % de sacarosa (m/v), 0.3 % de phytigel (m/v), a un pH de 5.8, suplementados con dos combinaciones de reguladores de crecimiento como se muestra en el Cuadro 2 y esterilizado por presión en la autoclave a 15 psi. Los reguladores de crecimiento utilizados fueron 2,4-D + BAP y 2,4-D + CIN. Este proceso se llevó a cabo en la campana de flujo laminar para mantener el cultivo aséptico. Posteriormente las cajas se colocaron en obscuridad a temperatura ambiente. Se evaluó el porcentaje de inducción de callo en las diferentes combinaciones determinando cual presenta la mejor respuesta.

Cuadro 2. Concentraciones de RCV para inducción de callo.

Tratamiento	BAP (μM)	2,4-D (μM)	Tratamiento	CIN (μM)	2,4-D (μM)
1	2.22	2.26	9	2.32	2.26
2	2.22	4.52	10	2.32	4.52
3	2.22	6.78	11	2.32	6.78
4	2.22	9.04	12	2.32	9.04
5	4.44	2.26	13	4.52	2.26
6	4.44	4.52	14	4.52	4.52
7	4.44	6.78	15	4.52	6.78
8	4.44	9.04	16	4.52	9.04

4.2 Inducción de brotes

Para la inducción de brotes se utilizaron callos de aproximadamente 5mm colocados en medio MS con 3% de sacarosa (p/v), 0.3% de phytigel (p/v), a un pH de 5.8 y suplementados con BAP + ANA a diferentes concentraciones. El trasplante se llevó a cabo en la campana de flujo laminar para asegurar la asepsia en el

cultivo. Las cajas fueron colocadas a temperatura ambiente y bajo el fotoperiodo natural. Para determinar las condiciones que presentan mayor respuesta en la inducción de brotes se determinó el coeficiente de formación de brotes (CFB). El Cuadro 3. Muestra las concentraciones de BAP y ANA que se utilizaron en cada tratamiento para la inducción de brotes.

Cuadro 3. Concentraciones de RCV para inducción de brotes.

Tratamiento	BAP μM	ANA μM
1	3	0
2	3	0.4
3	3	0.8
4	3	1.2
5	4	0
6	4	0.4
7	4	0.8
8	4	1.2
9	5	0
10	5	0.4
11	5	0.8
12	5	1.2
13	6	0
14	6	0.4
15	6	0.8
16	6	1.2

4.3 Rizogénesis

Para la determinación de las condiciones del medio de cultivo para inducción de raíces se tomaron plántulas de 20 días de edad, se les corto la raíz, posteriormente fueron colocadas en medio MS con 3 % de sacarosa (p/v), 0.3 % de phytigel (p/v), pH de 5.8 y suplementado con diferentes concentraciones de ANA. Los frascos fueron colocados a temperatura ambiente y con fotoperiodo natural. Se evaluó el número de plantas con respuesta, número de raíces por planta y longitud de la raíz, lo que permitió determinar las condiciones apropiadas para la inducción. El Cuadro 4 presenta los diferentes tratamientos utilizados en los experimentos de inducción de raíz, se puede observar la concentración que se utiliza de ANA en cada uno de los tratamientos.

Cuadro 4. Concentraciones de ANA para inducción de raíz.

Tratamiento	ANA (μM)
1	0
2	2.29
3	5.37
4	8.07

4.4 Aclimatación *ex vitro*

Las plántulas se retiraron del medio de cultivo, posteriormente se lavó la raíz con agua destilada estéril, en seguida se colocaron en una maceta con tierra esterilizada por presión en autoclave a 15 psi por 15 minutos, se regó con una solución 50 % de medio MS, después se le colocó una cubierta plástica y se mantuvo a temperatura ambiente con fotoperiodo natural. En el día 3 se regó con solución MS 50 % y se perforó la cubierta, en el día 5 se regaron con solución MS

25 % y se perforo la cubierta, en el día 7 se rego con MS 25 % y se perforo la cubierta, en el día 9 se rego con MS 10 % y se colocó la cubierta, al día 11 se riega con agua, al día 13 se retira la cubierta. Finalmente se evaluó el porcentaje de plantas que se adaptaron a las condiciones *ex vitro*. El Cuadro 5 muestra el cronograma de aclimatación a condiciones *ex vitro* por etapas, se puede observar la dilución del medio que se utilizó para regar y los días a los en que se perforo la cubierta plástica.

Cuadro 5. Condiciones de aclimatación.

Etapa	Riego con dilución	
	de MS	Perforación
1°(día 1-4)	50%	día 3
2°(día 5-8)	25%	día 5 y 8
3°(día 9-12)	10%	día 10 y 12
4°(día 13-15)	agua	Retirar cubierta el día 15

5. Resultados

La organogénesis como vía morfogénica de regeneración en el cultivo de tejidos vegetales, se lleva a cabo de manera directa o indirecta (Tucker y Laux, 2007). La formación de órganos *de novo* a partir de estas masas de células desdiferenciadas es llamada organogénesis indirecta. Donde podemos distinguir tres fases, la primera es la adquisición de competencia o la inducción de callo, la segunda etapa involucra la canalización y determinación de las células en cultivo a la formación específica de un órgano y la última etapa es la morfogénesis (Sugiyama, 1999). En los sistemas de regeneración vía organogénesis indirecta es necesario establecer la fuente de tejido vegetal, un protocolo de desinfección, evaluar diferentes tejidos como explante, probar diferentes interacciones de concentraciones RCV para establecer la inducción de callo, brotes, raíz y finalmente un periodo de aclimatación de condiciones *in vitro* a *ex vitro*. En el caso de diferentes especies de *Acacia* se han establecido con éxito sistemas de regeneración como embriogénesis somática, organogénesis directa e indirecta, sin embargo, las plantas leñosas son consideradas recalcitrantes al CTV. En el caso de *Acacia angustissima* no se ha reportado un sistema de regeneración, a pesar de ser una planta con potencial económico y ecológico. En este trabajo se establecen las condiciones para llevar a cabo la regeneración de esta planta nativa del país, vía organogénesis in directa. El sistema incluye el establecimiento de un protocolo de desinfección de semillas, selección de explante, evaluación de concentraciones de RCV para la inducción de callo, brotes, raíz y el establecimiento de un protocolo de aclimatación. A continuación se muestran los resultados obtenidos en los experimentos que se llevaron a cabo para el establecimiento del sistema de regeneración.

5.5 Desinfección y germinación de semillas

Para incrementar las posibilidades de regenerar una planta leñosa, recalcitrante al cultivo de tejidos vegetales, como *Acacia angustissima* se germinaron semillas en

medio MS para utilizar plantas juveniles como fuente de explante (Bhat y Chandel, 1991). De esta manera se obtuvo material vegetal estéril, debido a la naturaleza aséptica del cultivo, evitando el proceso de desinfección y daño de los tejidos vegetales ocasionado por este proceso, como se muestra otros sistemas de regeneración. El proceso consta de un escarificado y lavados con soluciones que aseguran la asepsia durante el cultivo. El escarificado acelera y homogeniza la germinación, adicionalmente elimina agentes contaminantes debido a la agresividad del tratamiento ya que generalmente se emplea ácido sulfúrico o clorhídrico concentrado. Sin embargo, a pesar de esto es común llevar a cabo lavados con soluciones de hipoclorito de sodio de 1 a 5% (v/v) con tween 20 como agente surfactante entre 20 y 40 minutos, el alcohol absoluto, alcohol 70 % (v/v) y el cloruro de mercurio también son empleados en la esterilización.

Se estableció un protocolo de desinfección que permitió establecer la germinación de semillas de *Acacia angustissima* y mantener la asepsia durante el cultivo. Este proceso involucraba el escarificado de la semilla y diversos lavados con el objetivo de eliminar cualquier agente contaminante. La Figura 4 muestra el proceso de desinfección. Podemos observar las semillas de *A. angustissima* recolectadas, el escarificado con ácido sulfúrico concentrado, lavado con hipoclorito 2 % (v/v), etanol absoluto, etanol 70 % (v/v) y las semillas al final del protocolo previo a la inoculación, donde claramente podemos observar que posteriormente al escarificado y el primer lavado con hipoclorito de sodio, una parte de las semillas muestra una coloración amarilla debido a que el ácido sulfúrico a degradado por completo el pericarpio de la semilla causando daño al embrión e impidiendo su germinación. Esto se atribuye a que las semillas que presentan este problema tienen un pericarpio delgado, por lo que el tratamiento por 5 minutos con ácido sulfúrico degrada por completo esta capa. Mientras que en la mayoría de las semillas lo degrada de tal manera que facilita la germinación. La evaluación del protocolo de desinfección de semillas se llevó con respecto al tiempo, en medio MS con 3 % de sacarosa. Monitoreando el número de semillas germinadas y la contaminación presente en los frascos con medio. El Cuadro 6 muestra estos

resultados, número de semillas germinadas, porcentaje de germinación y porcentaje de contaminación. Se muestra que la desinfección resultó efectiva, al permitir la germinación exitosa de plántulas en condiciones *in vitro* libres de contaminación, a temperatura ambiente y bajo fotoperiodo natural. También apreciamos que a lo largo de 18 días de cultivo no se presentó contaminación en los cultivos. Por otra parte a pesar del porcentaje de semillas dañado durante el proceso de escarificación, obtuvimos al día 4 una germinación de 61.76 %. Teniendo como resultado una germinación rápida y homogénea, a diferencia de la germinación que presentan las semillas sin escarificación donde se presenta una germinación heterogénea en cuanto al tiempo. Se ha reportado que de manera natural que las semillas de *Acacia angustissima* presentan una germinación aproximada de 80 %, semejante a la obtenida *in vitro*. La Figura 5 muestra una plántula de *Acacia angustissima*, germinada bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Se puede observar que estas no muestran signos de vitrificación y otras alteraciones fisiológicas. Por otra parte, también se puede observar que el cultivo no presenta contaminación, como resultado del tratamiento de desinfección. Los medios de cultivo empleados como el MS con 3 % de sacarosa, son susceptibles a contaminación por hongos y bacterias. En mayoría de los casos se reporta el uso de antibióticos para mitigar la contaminación por bacterias. Sin embargo, estos presentan efectos secundarios en las condiciones del medio de cultivo, la presencia de antibióticos en el medio tiene un efecto negativo al inhibir la formación de órganos, mientras que en otras ocasiones promueve la morfogénesis, esto depende del antibiótico y concentración a la que se utilice, como lo demostrado en la organogénesis en manzana donde Cefatoxina a dosis de 250 mg/L incrementa la regeneración y el desarrollo de brotes, mientras que la Carbendicilina a dosis de 500 mg/L induce una abundante formación de callo e inhibe la regeneración (Yepes y Aldwinckle, 1994)



Figura 4. Protocolo de desinfección de semillas.

1) Semillas de *Acacia angustissima* previo al proceso de desinfección. 2) escarificado con ácido sulfúrico concentrado. 3) Lavado con hipoclorito de sodio 2 % (v/v). 4) Lavado con etanol absoluto. 5) Lavado con etanol 70 % (v/v). 6) Semillas desinfectadas en una caja de petri con papel filtro estéril.

Cuadro 6. Resultados de desinfección y germinación *in vitro*.

Día	Semillas germinadas	Porcentaje de germinación	Porcentaje de contaminación
4	63	61.76	0
5	69	67.64	0
6	72	70.58	0
7	73	71.56	0
11	76	74.5	0
14	78	76.47	0
18	79	77.47	0

El cuadro 6. Muestra la evaluación del protocolo de desinfección con respecto al tiempo. El periodo de evaluación va del día 0 con la inoculación de las semillas hasta el día 18. Durante este periodo se evaluó el porcentaje de germinación de semillas de *Acacia angustissima*, se observa un rápida germinación entre el día 0 y 4 donde se alcanza el 61.76 %. Esto es resultado del escarificado que permite una germinación rápida y homogénea en semillas de testa dura como esta. En los días posteriores se incrementa la germinación, logrando al día 18 un porcentaje de 77.47 % de inducción. A lo largo del experimento se observó que los cultivos se mantuvieron asépticos. De esta manera establecemos que el protocolo de desinfección asegura la asepsia durante el cultivo y permite una germinación rápida y homogénea en semillas de *Acacia angustissima* germinada en medio MS.



Figura 5. Plántula de *Acacia angustissima* in vitro.

Se observa una plántula de germinada en medio MS con 3 % de sacarosa (p/v), el cultivo se mantuvo a fotoperiodo natural y temperatura ambiente. Las plántulas obtenidas se muestran saludables, sin afecciones fisiológicas. Aptas para utilizarse como fuente de tejido vegetal.

5.6 Selección del explante

La organogénesis indirecta involucra la inducción de callo a partir de explantes, fracciones de tejido vegetal diferenciado. Comúnmente se emplean hipocotilos, cotiledones, hojas, tallos y raíces en el CTV. Para establecer la inducción de callo en un modelo leñoso de difícil regeneración como *Acacia angustissima* la selección del explante es indispensable, debido a que el estatus de salud y desarrollo del tejido madre es crítico en la producción exitosa de brotes adventicios. Este proceso de evaluación de tejidos es un parámetro a considerar en los experimentos de regeneración. Se ha observado que diferentes tejidos presentan variación en el potencial de inducción de órganos o embriones somáticos, por lo que la elección del tejido se vuelve central al igual que la evaluación de los reguladores de crecimiento vegetal y condiciones de cultivo (Piqueras y col., 2010).

El establecimiento de cultivos *in vitro* de una gran cantidad de especies vegetales, especialmente las plantas leñosas, ha sido obstaculizado por el oscurecimiento letal del explante y del medio de cultivo. Generalmente es resultado de la oxidación ocasionada por compuestos fenólicos liberados en los extremos del corte en los tejidos, por acción de polifenoloxidasas, peroxidasa o el aire. Los productos de oxidación, llamados quinonas, son conocidos por ser altamente reactivos e inhibir la actividad enzimática conduciendo a la muerte de los explantes (Bhat y Chandel, 1991).

Las estrategias empleadas para superar los efectos perjudiciales de la oxidación de explantes, son estrategias de neutralización de compuestos tóxicos y evitando la acumulación de estos en el medio de cultivo. Esto incluye:

- Elegir explantes de tejido juvenil.
- Llevar a cabo los cultivos en obscuridad.
- Intervalos cortos en la transferencia a medio fresco.
- Llevar a cabo el cultivo en medio líquido.
- Adicionando antioxidantes al medio.

- Remojando los explantes en agua o soluciones que contengan antioxidantes previo a la inoculación en el medio.
- Utilizando agentes absorbentes como carbón activado, polivinilpirrolidona, etc.
- Utilizar una concentración baja de sales y una apropiada de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo.

Tomando en cuenta estas consideraciones se llevó a cabo la selección de explante utilizando plántulas germinadas *in vitro* como fuente de tejido vegetal, evaluando cinco tejidos, nodo, cotiledón, hoja, hipocotilo y epicotilo. Estos fueron colocados en cajas de petri con medio MS suplementado BAP + 2,4-D. Las cajas inoculadas con los explantes se mantuvieron a temperatura ambiente en oscuridad. En la Figura 6 se muestra la fuente de tejido vegetal y los diferentes que se emplearon como explantes. Se observa que los explantes presentan un estatus de salud y desarrollo apropiado al no presentar alteraciones como vitrificación. El mantener los diferentes explantes bajo las mismas condiciones de cultivo permitió observar diferencias en el porcentaje de inducción de callo y las características físicas de este. Observar el potencial de inducción de callo que presenta cada explante bajo estas condiciones de cultivo permitió la selección del que presentó la mejor respuesta tomando en cuenta el porcentaje de inducción de callo y sus características morfológicas, en relación al tiempo de respuesta. El cuadro 7 se muestra los resultados obtenidos para cada uno de los tejidos utilizados en la inducción. Donde se colocaron 10 explantes por caja y se realizaron 3 repeticiones de cada uno. Evaluando el número de callos por caja, consistencia, color y porcentaje de inducción. Observando que el nodo y cotiledón presentaron un porcentaje de inducción de 100 %. Sin embargo, evaluando las características morfológicas del callo se determinó que los obtenidos de cotiledón presentaban un nivel de oxidación bajo con respecto a los inducidos a partir de nodo.

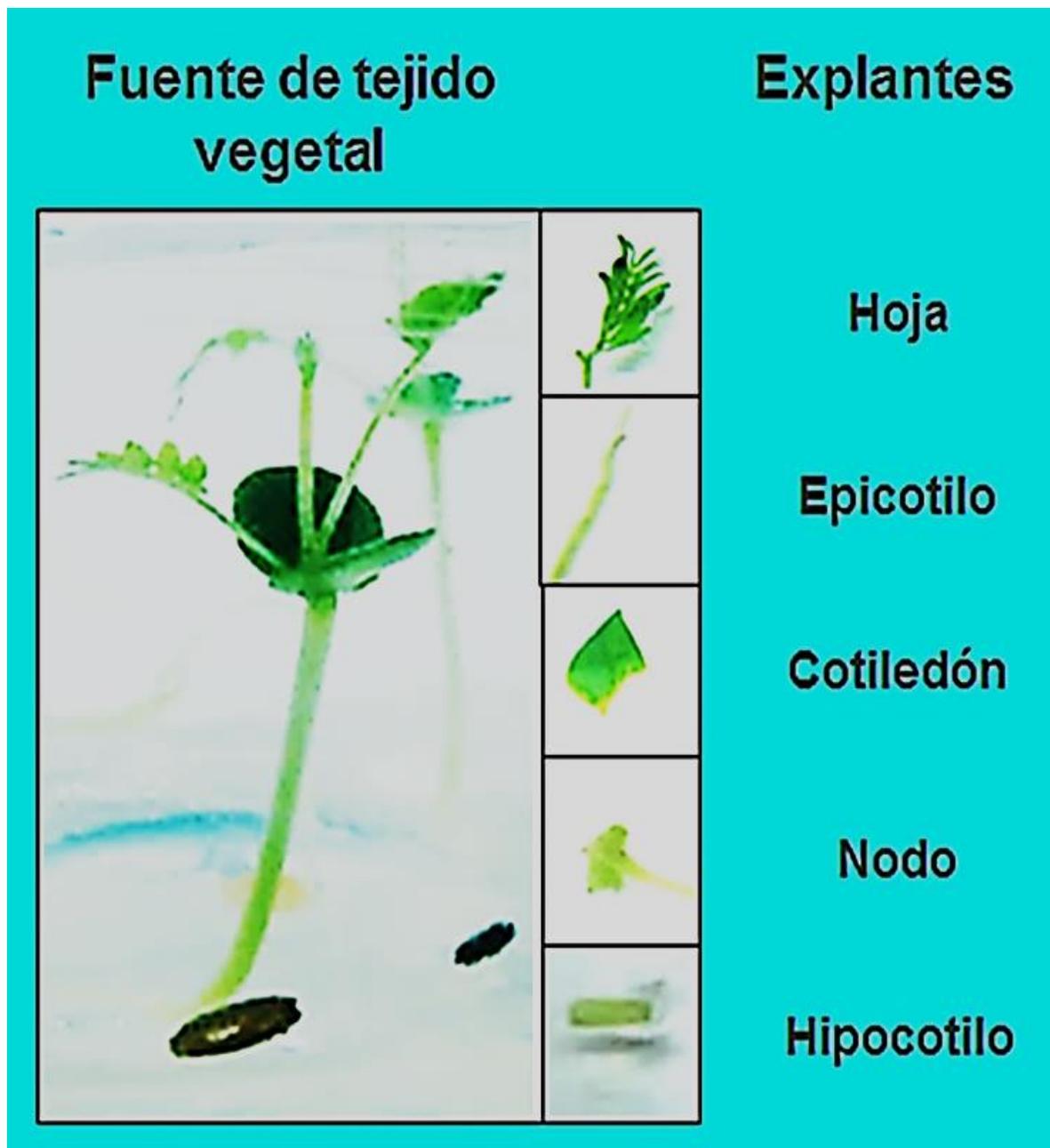


Figura 6. Fuente de tejido vegetal y explantes.

Se puede apreciar una plántula de *Acacia angustissima* 10 días después de la germinación, esta no presenta alteraciones fisiológicas, muestra las características de las plántulas utilizadas como fuente de explante. Se observan también los cinco tejidos utilizados como explante después de ser seccionados con bisturí.

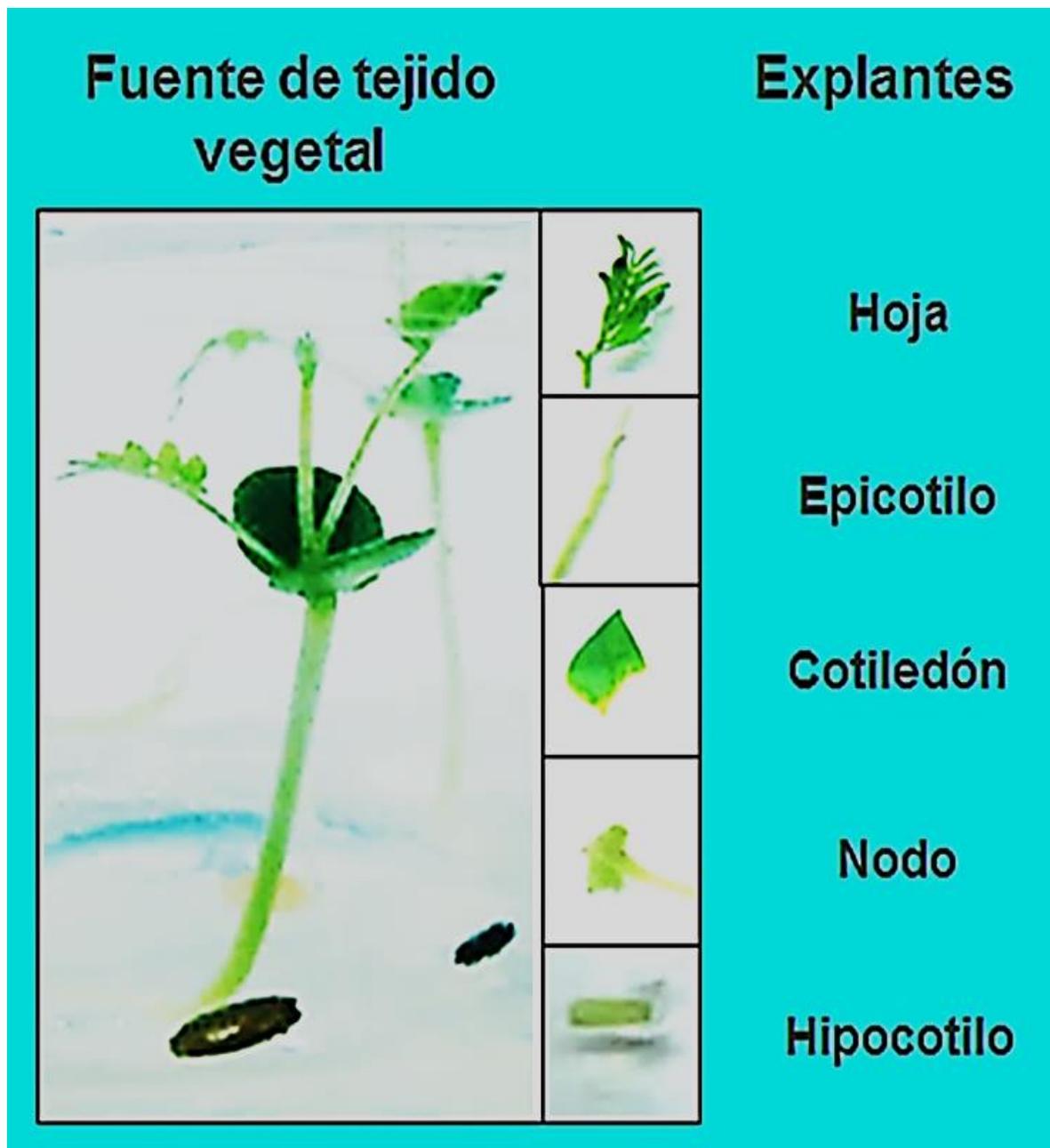


Figura 6. Fuente de tejido vegetal y explantes.

Se puede apreciar una plántula de *Acacia angustissima* 10 días después de la germinación, esta no presenta alteraciones fisiológicas, muestra las características de las plántulas utilizadas como fuente de explante. Se observan también los cinco tejidos utilizados como explante después de ser seccionados con bisturí.

Cuadro 7. Resultados de selección de explante

Tejido	No. de callos	Consistencia	Color	% de inducción
Nodo	10	Compacto	Blanco	100
	10	Semiblando	Blanco	
	10	Semiblando	Blanco - Amarillo	
Hoja	9	Compacto	Blanco-café	93.33
	10	Semiblando	Blanco	
	9	Semiblando	Café Claro	
Epicotilo	7	Semiblando	Café Claro	76.66
	8	Compacto	Café Claro	
	8	Compacto	Café Claro	
Hipocotilo	10	Compacto	Café Claro	96.66
	10	Blando	Blanco	
	9	Compacto	Blanco	
Cotiledón	10	Blando	Blanco	100
	10	Blando	Blanco	
	10	Semiblando	Blanco	

El cuadro 7 muestra la evaluación de cinco tejidos diferentes para ser utilizados como fuente de explante, los tejidos se sometieron a las mismas condiciones de cultivo para evaluar la respuesta de cada uno. Observamos que los tejidos que presentan mayor porcentaje de inducción son el nodo y el cotiledón. Mientras que la hoja e hipocotilo presentan porcentajes entre el 90 y 100 %. El que presenta el porcentaje más bajo es el epicotilo con un 76.66 %. Además del porcentaje de inducción de callo, se tomaron en cuenta las características morfológicas del callo, como consistencia y color, donde el cotiledón es que presenta la mejor respuesta, ya que es un callo blando y de color blanco, mientras que en los otros tejidos se observa la inducción de callos de consistencia compacta, con coloración amarilla y café claro. Basados en estas características se estableció que el tejido que

presenta la mejor respuesta es el cotiledón al presentar el mayor porcentaje de inducción de callos friables.

5.7 Evaluación de RCV en la inducción de callo.

La alta plasticidad de las células diferenciadas es una característica de las plantas, que permite generar masas de células desorganizadas, conocidas como callos. En la biología de plantas el término callo se refiere al crecimiento masivo de células y su acumulación en conglomerados. Estos pueden ser producidos de una sola célula diferenciada o bien de un conjunto de estas, involucrando un proceso de dediferenciación celular. Las células de callos son totipotentes, ya que tienen la habilidad de regenerar una planta completa. Sin embargo, es bien sabido que existe gran diversidad de callos basados en las características macroscópicas. Por ejemplo, callos que no presentan formación aparente de órganos se clasifican típicamente como friables o compactos, mientras que los que exhiben diferentes grados de regeneración son llamados callos organogénicos o embriogénicos, dependiendo de los órganos regenerados. Después del descubrimiento donde se mostró que el callo puede ser generado artificialmente *in vitro* y que el balance entre auxinas y citocininas, determina la dediferenciación celular, los callos han sido ampliamente utilizados en la investigación e industria (Ikeuchi y col., 2013).

Tomando en cuenta lo anterior una vez que se determinó que el cotiledón fue el tejido que presentó la mejor respuesta de inducción de callo al ser utilizado como explante. Se analizaron dos combinaciones de RCV. En esta ocasión se utilizó solo un tejido como explante, con el objetivo de evaluar diferentes tratamientos de RCV en el medio. Evaluamos BAP + 2,4-D y CIN + 2,4-D, a diferentes concentraciones estas se pueden observar en el Cuadro 2. El comportamiento de los explantes de cotiledón se muestra en el Cuadro 8. Donde se observa la evaluación de inducción de callos friables, no friables, explantes no inducidos y el porcentaje de inducción. En la combinación de BAP + 2,4-D el tratamiento 2, 3 y 4 presentó una respuesta

con la misma tendencia ya que como se puede observar los valores obtenidos en la inducción de callos friables, no friables y explantes no inducidos es semejante. Mientras que en los tratamientos 5, 6, 7 y 8 se presenta una diferencia muy marcada donde el tratamiento 6 mostró el promedio más elevado de inducción de callo. En el tratamiento 7 fue el único que presentó el 100% de inducción de callo, sin embargo, el 93.33% de los callos obtenidos fueron callos no friables. En el segundo barrido de concentraciones donde se evaluó CIN + 2,4-D a diferentes concentraciones, donde los tratamientos 12 y 16 son los que presentan mayor número de callos friables, a pesar de que el tratamiento 16 presenta una inducción del 100% solo el 50% de estos callos inducidos son friables. Mientras que el tratamiento 12 presenta 63.33% de inducción de callos friables, este valor fue el más elevado que se obtuvo a lo largo de los experimentos. Por lo que se determinó que el tratamiento con CIN (2.32 μ M) + 2,4-D (9.04 μ M) es el que presentaba la mejor respuesta en explantes de cotiledón en las condiciones experimentales de nuestro trabajo. Debido al incremento en la inducción de callo friable en los tratamientos, 9 al 12 y del 13 a 16. Donde podemos observar que este valor se incrementa a medida que aumenta la concentración de auxinas, se decidió evaluar hacer cuatro tratamientos adicionales donde se observó el comportamiento de los explantes con dos concentraciones más elevadas de 2,4-D. Podemos observar que los tratamientos 17 y 18 que son concentraciones consecutivas al tratamiento 12, se observa una disminución en la inducción de células desdiferenciadas, de la misma manera que en los tratamientos 19 y 20 que son consecutivos al 16. Estos resultados mostraron que el porcentaje de inducción de callos friables más elevado se obtuvo en la combinación de CIN (2.32 μ M) + 2,4-D (9.04 μ M) es el mejor resultado. La Figura 7 muestra las cajas de petri con los tratamientos del 1 al 16, donde podemos observar que los tratamientos 3, 1 y 16 son los que presentan callos de mayor tamaño. El tratamiento 12 presentó las mejores características morfológicas y la mayor cantidad de callos friables inducidos. Además presenta una visión general de las características de los callos inducidos. La Figura 8 muestra los

callos inducidos en diferentes tratamientos, el 1 corresponde al tratamiento 12, el 2 al tratamiento 16, el 3 al tratamiento 3 y el 4 al tratamiento 6.

Podemos observar que la del tratamiento los callos del tratamiento 6,3 y 16 presenta mayor coloración oscura que en el callo del tratamiento 12. Basado en estas observaciones podemos establecer que los callos que presenta menor grado de oxidación son los del tratamiento 12.

Cuadro 8. Resultados de inducción de callo.

T	BAP (µM)	2,4-D (µM)	Callos friables	Callos no friables	Explantos no inducidos	Inducción de callo %
1	2.22	2.26	0	8.66	1.33	86.66
2	2.22	4.52	4	4.66	1.33	86.66
3	2.22	6.78	5	3	2	80
4	2.22	9.04	4	4.66	1.33	86.66
5	4.44	2.26	0.66	4.66	4.66	53.33
6	4.44	4.52	4	4.33	1.66	83.33
7	4.44	6.78	0.66	9.33	0	100
8	4.44	9.04	0.33	7.33	2.33	76.66
	Cin (µM)	2,4-D (µM)				
9	2.32	2.26	0.33	7	2.66	73.33
10	2.32	4.52	1.66	4	4.33	56.66
11	2.32	6.78	4.33	3.66	2	80
12	2.32	9.04	6.33	3.33	0.33	96.66
13	4.52	2.26	0	3.66	6.33	36.66
14	4.52	4.52	2	4.33	3.66	63.33
15	4.52	6.78	2.33	6	1.66	83.33
16	4.52	9.04	5	5	0	100

El Cuadro 8 muestra los resultados de la evaluación de dos combinaciones de RCV (CIN + 2,4-D y BAP + 2,4-D) a diferentes concentraciones, donde observamos que en la primer columna se indica el número de tratamiento. En la parte superior observamos los resultados de la combinación de BAP + 2,4-D, donde se puede

observar el número de callos friables, de callos no friables (compactos y oxidados), el número de explantes no inducidos y el porcentaje total de inducción. El objetivo de hacer esta separación en la evaluación de la respuesta era determinar el tratamiento en el que se presentara el mayor número de callos friables, ya que como podemos observar en los primeros 8 tratamientos, excepto el 5, presentan porcentajes de inducción superiores al 70 %. Sin embargo, el porcentaje de inducción no representa el mejor tratamiento. Esto se puede observar en el tratamiento 7 donde se presentó un porcentaje de inducción de 100 %, pero más del 90 % de ellos eran callos compactos y con un elevado grado de oxidación, lo cual no lo hace apto para la regeneración. En esta evaluación los tratamientos que exhiben los mejores resultados son el 3 y 6. Ambos presentan un porcentaje de inducción de 80% aproximadamente, sin embargo, la mitad de los callos obtenidos presentan las características como callo friable. En la combinación de CIN + 2,4-D se observaron en los tratamientos 12 y 16 porcentajes de callos friables más elevados que en la otra combinación de RCV. En este barrido se observó que a medida que se incrementó la concentración de 2,4-D se incrementó el porcentaje de inducción. Por esto fue necesario evaluar cuatro tratamientos más para observar el comportamiento de inducción de callo si se elevaba la concentración de 2,4-D.

Cuadro 9. Tratamiento adicional de Cin + 2,4-D.

T	Cin (µM)	2,4-D (µM)	Callos friables	Callos no friables	Explantes no inducidos	Inducción de callo%
17	2.32	11.3	3.66	3.33	3	70
18	2.32	13.56	1.66	5.66	2.66	73.33
19	4.52	11.3	4	3.33	2.66	73.33
20	4.52	13.56	3.33	4.33	2.33	76.66

El Cuadro 9 muestra los tratamientos adicionales que se realizaron para observar el comportamiento de los tejidos en cuanto a la inducción de callo, esto al incrementar

la concentración de 2,4-D en el medio de cultivo, se indica en la primer columna con una T el número de tratamiento. Podemos observar una disminución notoria en el porcentaje de callos friables. Tomando en cuenta estos resultados establecemos que la combinación de RCV en el medio de cultivo que permite obtener mayor cantidad de callos friables es CIN (2.32 μ M) + 2,4-D (9.04 μ M).

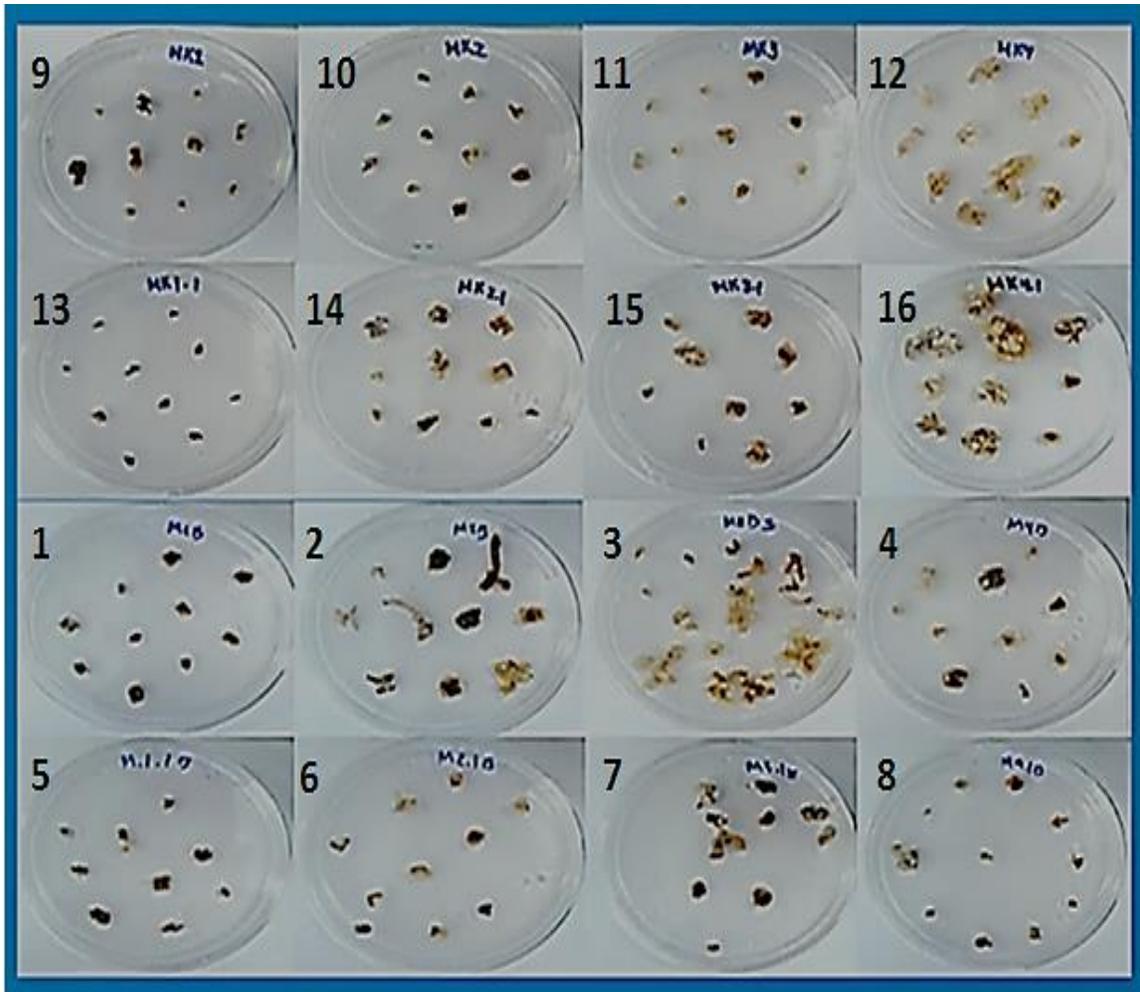


Figura 7. Respuesta de inducción de callo.

Podemos observar el efecto del medio de cultivo en explantes de cotiledón. El número indica el tratamiento al que corresponde cada imagen. Se trata de mostrar de manera general la respuesta, comparando las características morfológicas de los callos inducidos.

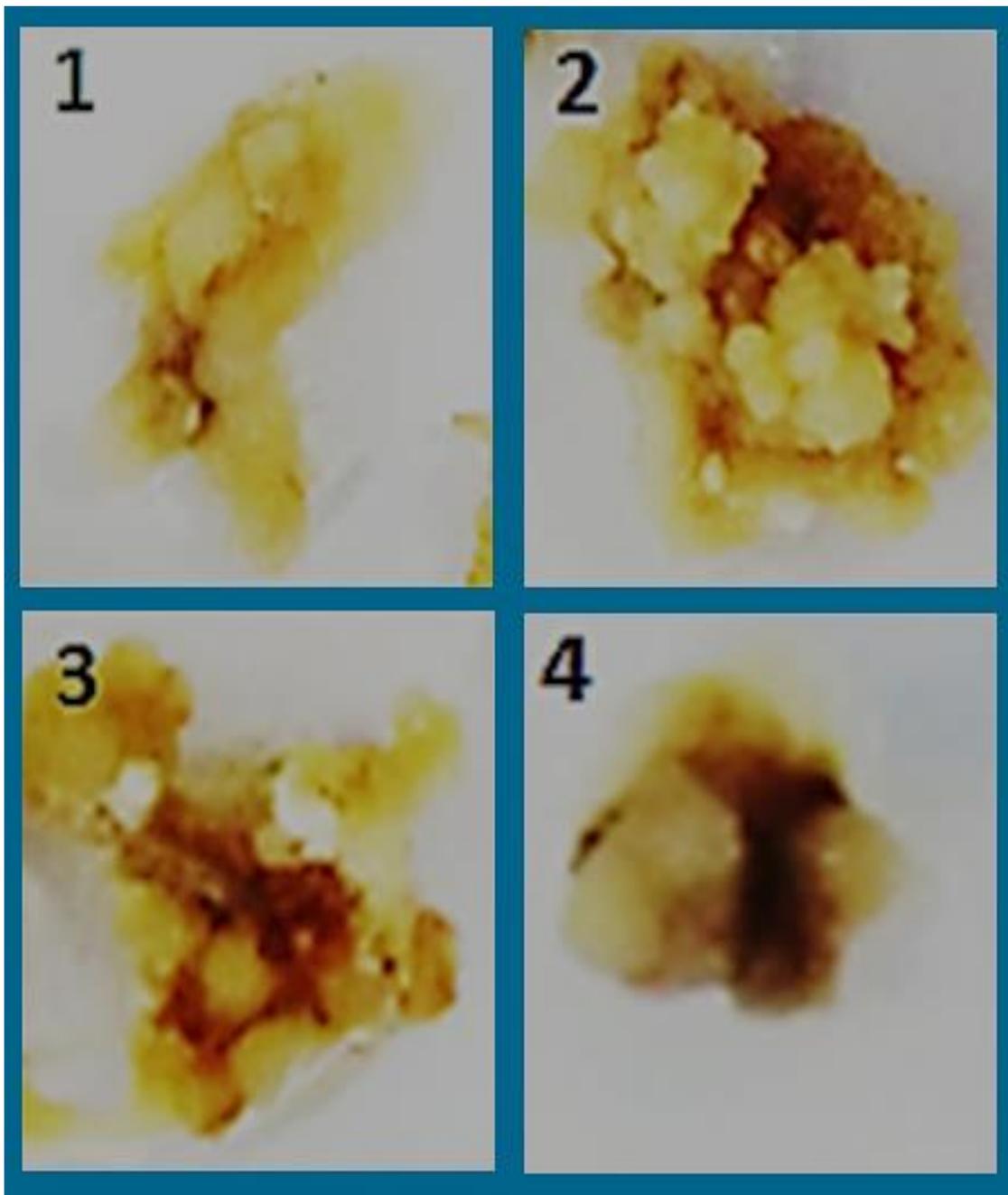


Figura 8. Callos inducidos tratamiento 12, 16, 3 y 6.

1) Tratamiento 16, 2) Tratamiento 12, 3) Tratamiento 3 y 4) tratamiento 6. Se observan fotografías tomadas en el estereoscopio, donde podemos observar las características morfológicas de los callos, resaltando la presencia de coloraciones oscuras en los tratamientos 12, 6 y 3.

5.8 Inducción de brotes

Las células que han adquirido competencia para la inducción de brotes durante la dediferenciación celular, inducción de callo, pueden ser inducidas a la formación de brotes por la aplicación de citocininas al medio (Sugiyama, 1999). En el cultivo de tejidos vegetales, el balance exógeno de auxinas y citocininas en el medio es esencial para la organogénesis *de novo*, jugando un rol importante en la determinación morfológica del callo. Donde la obtención de órganos está regulada por la relación de auxinas y citocininas (Zhao y col., 2008). La formación de órganos *de novo* se ve afectada por diversos factores como la presencia de compuestos fenólicos en los callos, antibióticos y concentraciones de RCV.

En este trabajo se evaluó BAP + ANA suplementado a diferentes concentraciones en medio MS para inducir la formación de brotes en callos de *Acacia angustissima* obtenidos de cotiledón bajo las condiciones que se determinaron con anterioridad. El objetivo de este experimento fue determinar las concentraciones de RCV adicionadas al MIC que presento mayor inducción de brotes. Para lo que se haría una evaluación basados en el coeficiente formador de brotes. La evaluación de los diferentes tratamientos se llevó a cabo a temperatura ambiente y fotoperiodo natural. La evaluación de formación de brotes se llevó a cabo con respecto al tiempo. Donde tras un cultivo de 25 días se comenzó a observar la aparición de grupos celulares con una coloración verde, indicando actividad fotosintética y lo que puede ser un brote. Sin embargo, no se observó el desarrollo de brotes en días posteriores en el tiempo que se reporta en trabajos con otras acacias.



Figura 9. Callo en inducción de brotes

Se observa la inducción de un grupo de células con coloración verde, indicando actividad fotosintética. Se observó la aparición de este grupo celular en el día 25 de contacto con el medio en el tratamiento cinco.



Figura 10. Callo sin respuesta en MIB.

Se muestra un callo en medio inductor de brotes que después de 30 días de contacto con el medio no muestra respuesta. A diferencia del anterior este presenta una mayor cantidad de compuestos fenólicos, asociado al color obscuro.

5.9 Rizogénesis

La inducción de raíz o rizogénesis está controlada por la aplicación exógena de auxinas en el medio. Donde de acuerdo a lo propuesto por Miller y Skoog el balance hormonal que promueve la formación de raíz es con una mayor relación de auxinas en el medio. En las técnicas de cultivo de tejidos generalmente se emplean medio suplementados con auxinas, aunque en algunos casos utilizar medio libre de RCV representan una alternativa que muestra mejores resultados.

Para las pruebas de enraizamiento directo, utilizamos plántulas germinadas *in vitro*, se les corto la raíz y fueron colocadas en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de ANA. Los frascos se mantuvieron a temperatura ambiente y bajo fotoperiodo natural. Evaluamos el número de plantas con raíz, número de raíces por planta y longitud en cm. Debido al efecto de inducción de callo mostrado en algunos tratamientos se evaluó el porcentaje de inducción de callo. Los resultados se muestran en el Cuadro 10 donde se puede observar que el número de raíces y la inducción de callo aumentan a medida que se aumenta la concentración de ANA. Mientras que el número de plantas con raíces y la longitud de la raíz disminuyen. Se observó la inducción de callo en los tratamientos donde se suplemento 5.37 y 8.07 μM de ANA. La Figura 9 muestra cómo se observó la inducción de la masa de células desdiferenciadas. La formación de callo obtenida al suplementar el medio con ANA a 5.37 y 8.07 μM . En el tratamiento con 5.37 μM de ANA fue de 53.33 %, mientras que en el medio suplementado con 8.07 μM fue de 93.33 % como se observa en el Cuadro 10. Mientras que a 2.29 μM de ANA se indujo un mayor número de raíces, pero mostraron pérdida de la arquitectura y gravitropismo, esto se observa en la Figura 10. En el experimento se incluyó medio libre de RCV, donde se observó el mayor número de plantas con respuesta y las raíces de mayor longitud. En este trabajo el medio de cultivo libre de auxinas presentó el mayor porcentaje de inducción, al obtener 24 plantas con formación de raíz. Mientras que a medida que se incrementaba la concentración de ANA en el medio, se observó que se incrementaba la inducción de callo y disminuía el número

de plantas que presentaban raíz. La Figura 11 muestra la raíz inducida en medio libre de RCV, en estas condiciones se obtuvo la formación de raíces con mayor longitud que las obtenidas en medios con ANA, además se observaba la ausencia de alteraciones como falta de gravitropismo y pérdida de arquitectura de la raíz, que corrobora que estas afecciones son un efecto de la presencia de auxinas en el medio. La Figura 12 muestra una comparación del efecto de los diferentes tratamientos de inducción de raíz. Mostrando que la presencia de ANA en el medio de enraizamiento afecta la formación de raíz, con la inducción de callo, pérdida de gravitropismo y arquitectura. Mientras que el medio MS promueve la formación de una raíz de características similares a la que se presenta cuando se germina una semilla. Los tratamientos con ANA disminuyeron el número de plantas que presentaron inducción de raíz, pero se obtuvo un mayor número raíces como se puede observar en la Tabla 9 donde en medio libre de hormonas obtuvimos 2.26 raíces por planta, mientras que en medio con 8.07 μM de ANA obtuvimos en 8.75 raíces por planta. Sin embargo, las raíces obtenidas presentaban alteraciones como la pérdida del gravitropismo y arquitectura de la raíz como se puede observar en la Figura 12. que muestra una imagen de una raíz inducida a con medio suplementados con 2.29 μM de ANA. La inducción de raíz de en plántulas de *Acacia angustissima* de manera directa, permitió evaluar el comportamiento en medio MS suplementado con diferentes combinaciones de ANA.

Cuadro 10. Resultados inducción de raíz con ANA.

ANA (μM)	No. Plantas	No. Raíces	Longitud (cm)	inducción de callo %
0	24	2.26	5	0
2.29	16	3.57	3	0
5.37	12	4.8	3	53.33
8.07	8	8.75	2	93.33



Figura 11. Efecto de induccion de callo en medio con ANA.

Se observa la induccion de callo en el medio MS suplementado con 5.37 y 8.07 μM de ANA. La proliferación de las células al estadio de callo fue por efecto de ANA en el medio de cultivo. La formacion de callo no solo impidio la rizogenesis, sino que tambien afecto el número de plantas con raíz, ya que la gran mayoría de las plantas que mostraron la inducción de callo no presentaron raíz. Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente y bajo un fotoperiodo natural.



Figura 12. Raíz inducida en MS con ANA 2.29 μM .

Podemos observar que la inducción de raíz en el tratamiento con 2.29 μM de ANA suplementado al medio MS fue deficiente. Las raíces obtenidas en presentan un alteraciones fisiologicas evidentes, como la perdida del gravitropismo y la arquitectura de la raíz. Estos dos procesos estan controlados de maner natural por el balance de auxinas.



Figura 13. Raíz inducida en medio MS libre de RCV.

Se puede observar que el medio MS libre de RCV es capaz de inducir la rizogénesis. Este tratamiento mostro la inducción de raíces sin afecciones fisiológicas. No se observa la inducción de callo, por lo que se comprueba que la inducción de este es por efecto de ANA en el medio de cultivo. Las raíces obtenidas bajo estas condiciones son de mayor longitud, además no presentan pérdida del gravitropismo y de la arquitectura.

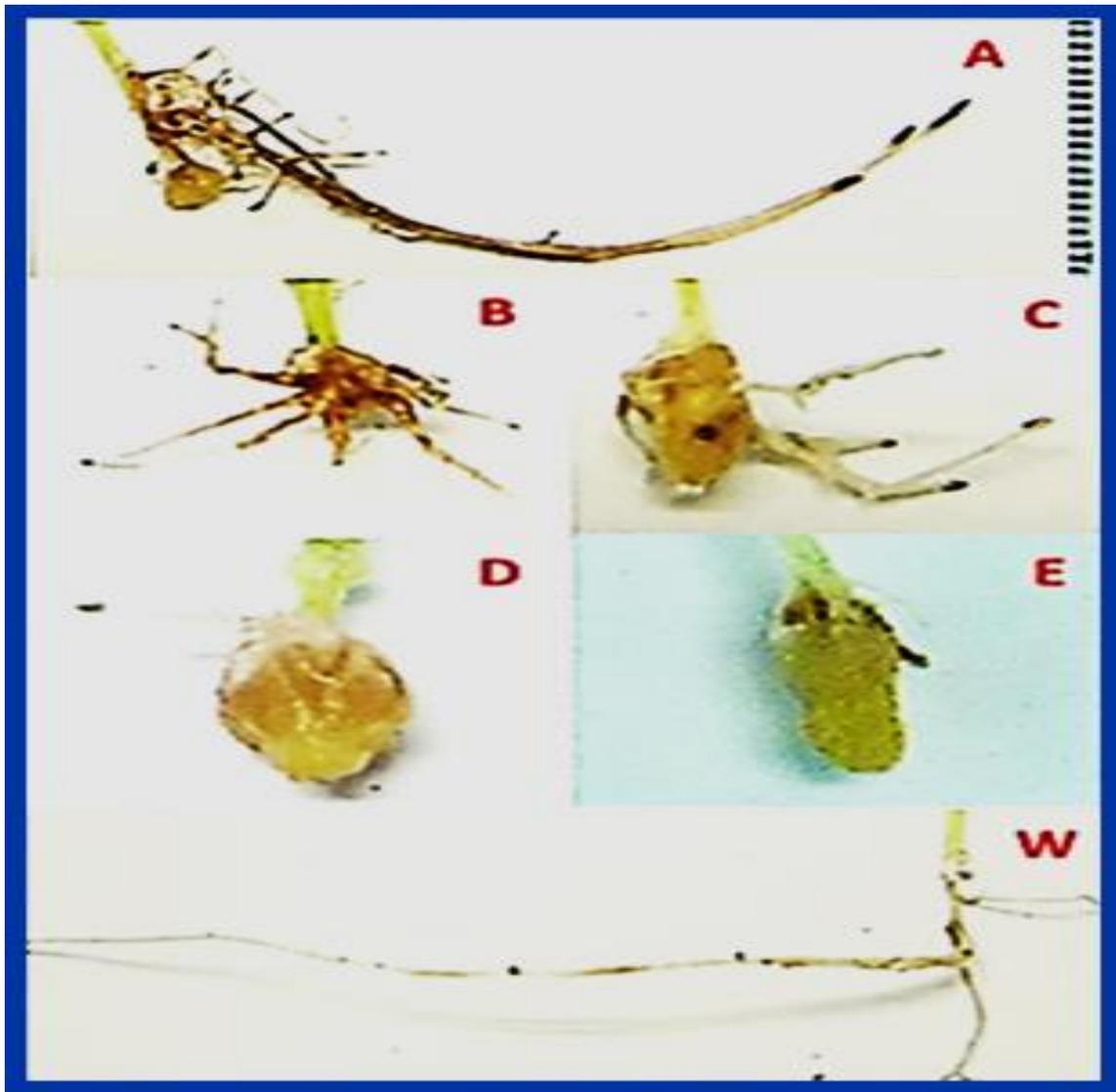


Figura 14. Comparación de tratamientos de inducción de raíz.

A) Medio libre de RCV. B) Medio suplementado con 2.29 μM de ANA. C) Medio suplementado con 5.37 μM de ANA. D) Medio suplementado con 8.07 μM de ANA. E) Medio suplementado con 9.1 μM de ANA. W) Raíz de una plantula de *Acacia angustissima* germinada *in vitro* en medio MS. Se observa el efecto de el ANA suplementado al medio, podemos ver las características de las raíces de cada tratamiento comparando con la raíz que se desarrolla del embrión en la germinación de la semilla. Donde claramente se ve que la presencia de ANA el medioafecta la inducción de raíz.

5.10 Aclimatación *ex vitro*

La aclimatación de las condiciones *in vitro* a *ex vitro* se llevó a cabo de acuerdo al periodo de aclimatación que se menciona en el Cuadro 11. Generalmente para hacer un cambio paulatino que permita obtener una mayor cantidad de plantas adaptadas al cultivo en condiciones ambientales. Se colocan las plantas en un sustrato estéril, después son protegidas con una cubierta plástica y regada con diluciones del medio de cultivo. La cubierta regula la humedad y el intercambio gaseoso, pero esta debe ser perforada gradualmente, mientras que cada vez se riega con una solución más diluida, para aumentar la tasa fotosintética de la planta hasta que se retira la cubierta y los riegos se realizan con agua. A este periodo de tiempo se le llama aclimatación y es uno de los pasos limitantes en el rendimiento de plántulas regeneradas. En este trabajo la aclimatación de plántulas *in vitro* de *Acacia angustissima* se llevó a cabo utilizando tierra estéril, cubriendo las macetas con una bolsa plástica que se perforo como se muestra en el cronograma donde también se observan cómo se llevaron a cabo los riegos con diluciones del medio MS. Durante el periodo de aclimatación se cuantificó el número de decesos en cada paso, con el objetivo de identificar en que parte del protocolo fue donde se presentó el mayor número de muertes. El Cuadro 12 muestra los resultados obtenidos en el primer experimento. En esta primera aproximación solo el 22.5 % de las plantas sobrevivieron hasta la etapa de retirar la cubierta plástica, sin embargo todas murieron en un par de semanas después tioladas y contaminadas por hongos. Las etapas donde se presentó mayor pérdida de plantas fueron la 3ª y 4ª, pero los problemas se observaron desde la primera etapa, ya que al regar por inundación se saturaba el sustrato, este exceso de medio provoco una muy alta humedad y se volvió un medio susceptible a contaminación. De esta manera al final del periodo de aclimatación se presentó una mayor cantidad de pérdida de plántulas debido a la contaminación del sustrato y a plántulas tioladas. Se llevó a cabo un segundo experimento tomando en cuenta las siguientes consideraciones, la tierra estéril se humedeció con agua destilada estéril, los riegos se realizaron por goteo utilizando una jeringa con aguja para evitar retirar la bolsa plástica, controlando de esta

manera la contaminación y los efectos causados por la alta humedad que se presentaron al regar por inundación. Los resultados obtenidos en la segunda evaluación del proceso de aclimatación propuesto para acacia angustissima, se muestran en el Cuadro 13 donde se puede observar que se incrementó la sobrevivencia que llegaron a la cuarta etapa, comparado con los resultados anteriores incrementamos sobrevivencia de 87.5 a 92.5 %, en la tercera de 62.5 a 77.5 % y en la cuarta de 22.5 a 45 %.

Cuadro 11. Cronograma de aclimatación.

Etapa	Riego con dilución	
	de MS	Perforación
1°(día 1-4)	50 %	día 3
2°(día 5-8)	25 %	día 5 y 8
3°(día 9-12)	10 %	día 10 y 12
4°(día 13-15)	agua	Retirar cubierta el día 15

Cuadro 12. Resultados primer experimento de aclimatación.

Etapa	No. Plantas muertas por etapa	Sobrevivencia %
1°	0	100
2°	5	87.5
3°	10	62.5
4°	16	22.5

El Cuadro 12 muestra los resultados del primer experimento de aclimatación donde se puede observar que en la tercera y cuarta etapa es donde se presenta el mayor número de muertes, esto se atribuye a la contaminación y a la inundación del sustrato que se presentó en los riegos. Logrando solo el 22.5 % de sobrevivencia.

Cuadro 13. Resultados de aclimatación del segundo experimento.

Etapa	No. Plantas muertas por etapa	sobrevivencia %
1°(día 1-4)	0	100
2°(día 5-8)	3	92.5
3°(día 9-12)	6	77.5
4°(día 13-15)	13	45

El Cuadro 13 muestra los resultados después de las modificaciones hechas al primer protocolo de aclimatación, podemos observar que se logró mitigar la muerte de las plantas en todas las etapas, en la segunda y tercera hasta el 50 %. Logrando un porcentaje final de 45 % de sobrevivencia.

6. Discusión

Previo a este trabajo se han reportado sistemas de regeneración para *acacias* vía organogénesis indirecta donde se evaluaron diferentes tejidos como fuente de explante, a continuación se describen algunos ejemplos que nos permitirán comparar la información.

Selección del explante

En *Acacia sinuata* se evaluaron tres tejidos, hipocotilo, cotiledón y hojas jóvenes como fuente de explante, en medio MS con 3 % de sacarosa y suplementado con BAP (2.22 μ M) + 2,4-D (6.78 μ M). Se reportó que los explantes de hipocotilo presentaban un 90 % de inducción (Vengadesan y col. 2000). Posteriormente se reportó el uso de cotiledón en medio MS con 3 % de sacarosa y suplementado con BAP (2.22 μ M) + ANA (8.1 μ M) reportando un 75 % de inducción de callo en *Acacia sinuata* (Vengadesan y col. 2003). Se ha reportado también la evaluación de nodo, puntas de brote y cotiledón para *Acacia mangium* en medio MS suplementado solo con BAP (4 μ M) y un segundo tratamiento con BAP (4 μ M) + ANA (0.5 μ M). Donde el nodo presento 99.33 % para la primera combinación, 89.33 % para la segunda, el cotiledón 80.67 y 80 % respectivamente y el porcentaje de inducción de las puntas brotes fue de 51.67 y 42.67 para cada uno de los explantes (Shahinozzaman y col. 2012).

Comparando nuestros resultados con lo mencionado anteriormente, donde obtuvimos un 100 % de inducción de callo para el cotiledón y nodo, podemos decir que estos tejidos en conjunto con el hipocotilo y la hoja son los que presentan un mayor porcentaje de inducción. El grado de inducción que presentaron el cotiledón y nodo de *Acacia angustissima* se atribuye a las características fisiológicas propias del tejido. Por otra parte la baja tasa de inducción del epicotilo, que en las condiciones experimentales alcanzó el 76.66 % fue atribuido al tamaño del explante ya que este tejido es muy delgado.

6. Discusión

Previo a este trabajo se han reportado sistemas de regeneración para *acacias* vía organogénesis indirecta donde se evaluaron diferentes tejidos como fuente de explante, a continuación se describen algunos ejemplos que nos permitirán comparar la información.

Selección del explante

En *Acacia sinuata* se evaluaron tres tejidos, hipocotilo, cotiledón y hojas jóvenes como fuente de explante, en medio MS con 3 % de sacarosa y suplementado con BAP (2.22 μ M) + 2,4-D (6.78 μ M). Se reportó que los explantes de hipocotilo presentaban un 90 % de inducción (Vengadesan y col. 2000). Posteriormente se reportó el uso de cotiledón en medio MS con 3 % de sacarosa y suplementado con BAP (2.22 μ M) + ANA (8.1 μ M) reportando un 75 % de inducción de callo en *Acacia sinuata* (Vengadesan y col. 2003). Se ha reportado también la evaluación de nodo, puntas de brote y cotiledón para *Acacia mangium* en medio MS suplementado solo con BAP (4 μ M) y un segundo tratamiento con BAP (4 μ M) + ANA (0.5 μ M). Donde el nodo presento 99.33 % para la primera combinación, 89.33 % para la segunda, el cotiledón 80.67 y 80 % respectivamente y el porcentaje de inducción de las puntas brotes fue de 51.67 y 42.67 para cada uno de los explantes (Shahinozzaman y col. 2012).

Comparando nuestros resultados con lo mencionado anteriormente, donde obtuvimos un 100 % de inducción de callo para el cotiledón y nodo, podemos decir que estos tejidos en conjunto con el hipocotilo y la hoja son los que presentan un mayor porcentaje de inducción. El grado de inducción que presentaron el cotiledón y nodo de *Acacia angustissima* se atribuye a las características fisiológicas propias del tejido. Por otra parte la baja tasa de inducción del epicotilo, que en las condiciones experimentales alcanzó el 76.66 % fue atribuido al tamaño del explante ya que este tejido es muy delgado.

Evaluación de RCV en la inducción de callo.

La inducción u obtención de callo, es la formación de un conjunto amorfo de células con una tasa alta de proliferación, a partir de un explante. El control de este fenómeno está dado por la concentración de auxinas y citocininas, en el medio de cultivo. Se dice que para la inducción de callo la concentración de auxinas vs citocininas debe ser igual. Sin embargo, comúnmente se emplean barridos de concentraciones, donde se observa el comportamiento de la inducción de callo en las diferentes interacciones permitiendo la determinación de la combinación que presenta el mejor resultado tomando en cuenta el porcentaje de inducción, color y consistencia del callo. Estas características de los callos inducidos permiten clasificados como friables o no friables, un callo friable es aquel que presenta generalmente una coloración blanca y consistencia suave, mientras que un callo no friable presenta una coloración amarilla, café, consistencia compacta y dura. Estas características condicionan la regeneración.

Para establecer un protocolo de regeneración vía organogénesis indirecta es necesario establecer las condiciones para la obtención de callos friables. El establecimiento de estas condiciones se lleva a cabo evaluando diferentes concentraciones de una combinación de auxinas y citocininas, buscando la inducción de células friables. Experimentos de esta naturaleza permiten observar el comportamiento y respuesta, para discriminar en base a características morfológicas determinando las condiciones en las que se presenta la respuesta.

La inducción de callo depende del explante y de las concentraciones de auxinas y citocininas en el medio de cultivo. Una vez que se estableció el cotiledón sería el tejido que se utilizaría como explante se evaluó la interacción de diferentes concentraciones de auxinas y citocininas, con el objetivo de observar el comportamiento de la inducción de callo en los diferentes tratamientos, y establecer así las condiciones de inducción de callo.

En trabajos reportados previamente para regeneración de acacias por organogénesis indirecta se evaluaron diferentes combinaciones de reguladores de

crecimiento. En *Acacia sinuata* se probaron los tratamientos que se emplearon en este trabajo, donde se determinó que porcentaje de inducción de callo a 2,4-D (9.04 μM) + BAP (2.22 μM) para explantes de hipocotilo (Vengadesan y col. 2000). Posteriormente en esta misma acacia se evaluaron combinaciones de ANA + BAP y CIN + ANA, utilizando como explante el hipocotilo, el mejor resultado se obtuvo con ANA (8.1 μM) + BAP (2.22 μM) con un 75 % de inducción de callo (Vengadesan y col. 2003).

En este trabajo se tomó en cuenta lo reportado por Vengadesan y colaboradores en 2000 y 2003; por esto fue que se evaluaron combinaciones de 2,4-D + BAP y 2,4-D y CIN. A diferencia de lo reportado con *Acacia sinuata* nosotros obtuvimos que la CIN y 2,4-D presentó una respuesta mejor, esto al obtener una mayor cantidad de callos friables y de mayor tamaño en cotiledones de *Acacia angustissima*. También el porcentaje de inducción que hemos obtenido es mayor a lo reportado por en *Acacia sinuata*.

Inducción de brotes

La inducción de brotes en organogénesis indirecta se origina de un grupo de células llamado meristemoide, que dan origen a un brote. Esto una vez que las células del explante vuelven competentes. La morfogénesis *in vitro* de órganos *de novo*, está controlada por el balance hormonal entre auxinas y citocininas, para la obtención de brotes, generalmente la concentración de citocininas es más elevada que la de auxinas en el medio de cultivo. Este fenómeno se afecta cuando se utilizan células que han permanecido demasiado tiempo en estadio de callo o por otros factores como la presencia de antibióticos en el medio de cultivo.

En este trabajo se evaluaron diferentes concentraciones de BAP y ANA para la inducción de brotes, como se muestra en el Cuadro 4. En callos obtenidos a partir de explantes juveniles de *Acacia angustissima*. Fueron colocados en cajas de petri a razón de 10 explantes por caja con tres repeticiones por tratamiento. Una vez que

se llevó a cabo el trasplante en medio inductor de callo (MIC) las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente y bajo fotoperiodo natural. La evaluación de obtención de explantes se con respecto al tiempo y CFB (coeficiente formador de brotes). Después de seguir la respuesta de la formación de brotes en callos por 30 días, no se registró formación de brotes.

De acuerdo con lo reportado anteriormente en la regeneración *in vitro* por organogénesis indirecta de *Acacia sinuata* donde se evaluó medio MS con 10 % de agua de coco y diferentes concentraciones de BAP + AIA, el mayor número de brotes por explante fue de 2.6 y se logró con BAP (13.2 μM) + AIA (3.42 μM) (Vengadesan y col., 2000). Posteriormente se probó BAP y Zeatina diferentes concentraciones en medio MS 50 % y 10 % de agua de coco, donde el mayor número de brotes se obtuvo Zeatina (2.5 μM) + BAP (13.3 μM) presentando 25 brotes por explante (Vengadesan y col., 2003).

Rizogénesis

En trabajos previos en *Acacia sinuata* se reporta un tasa alta de enraizamiento en medio MS 50 % suplementados con 7.4 μM de AIB (Vengadesan y col. 2003). Posteriormente en acacia mangium se reportó medio MS suplementados con AIB 8 μM (Shahinozzaman y col., 2012). Estos resultados son contrastantes con lo obtenido en nuestro trabajo al utilizar medio MS con ANA, ya que muestra efectos secundarios en las plantas. También en lo reportado por Vengadesan y colaboradores en 2000, donde el enraizamiento de acacia sinuata se induce con un medio suplementado con 7.36 μM de AIB. Sin embargo, posteriormente en este trabajo se evaluó el efecto de medio MS suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D, ANA y AIA, mostrando que la presencia de estas auxinas en el medio promueve la formación de callo (Vengadesan y col. 2000).

Aclimatación *ex vitro*

La adaptación de cultivo *in vitro* a condiciones *ex vitro* en cultivo de tejidos vegetales, permite adaptar las plantas regeneradas a las condiciones de cultivo *ex vitro*, esto en una forma gradual para asegurar un porcentaje alto de supervivencia. Las plantas en condiciones de cultivo *in vitro*, se encuentran bajo condiciones de cultivo que les aporta macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y sacarosa como fuente de carbono; además con alta humedad relativa, bajo temperatura y fotoperiodo controlados. Como consecuencia de estas condiciones las plantas desarrolladas presentan alteraciones fisiológicas como atrofia en la apertura y cierre de estomas, cutícula delgada, poca tolerancia al intercambio gaseoso y una tasa fotosintética baja. Por ende un cambio brusco en las condiciones de cultivo condiciona la sobrevivencia de las plantas.

Los reportes de aclimatación en sistemas de regeneración de acacias regeneradas por organogénesis indirecta, en acacia sinuata se reportó un 40 % de aclimatación (Vengadesan y col., 2003), posteriormente en este modelo se reportó un 45 % de aclimatación (Vengadesan y col., 2003). Mientras que para *Acacia mangium* se reportó un porcentaje de aclimatación del 65 % (Shahinozzaman y col. 2012). Comparando el resultado obtenido con el protocolo de aclimatación que se estableció se ha logrado obtener un porcentaje de sobrevivencia igual al reportado en *Acacia sinuata* en 2003 y menor al reportado para *Acacia mangium*.

7. Conclusiones

- Se estableció un protocolo de desinfección que aseguro la asepsia en la germinación *in vitro* de semillas de *Acacia angustissima*, mostrando una germinación rápida y homogénea.
- La evaluación realizada de cinco tejidos como fuente de tejido vegetal, permitió comparar la respuesta de los diferentes explantes, determinando que el cotiledón presento la mejor respuesta basados en el porcentaje de inducción y las características morfológicas del callo.
- Evaluamos dos combinaciones de RCV a diferentes concentraciones en medio MS para la inducción de callo, tomando en cuenta el porcentaje de inducción de callo y las características morfológicas se determinó que el mejor resultado se presentó en medio MS suplementado con CIN (2.32 μ M) + 2,4-D (9.04 μ M).
- Después de 30 días en contacto con el medio de MS suplementado con RCV de acuerdo a los tratamientos mencionados, se observó que BAP + ANA a diferentes concentraciones no promueven la inducción de brotes en callos de *Acacia angustissima*, esto bajo las condiciones del experimento.
- Para llevar a cabo la rizogénesis se determinó que el medio MS libre de RCV promueve la formación de raíces sin alteraciones fisiológicas, mientras que en presencia de ANA se observó inducción de callo, pérdida de gravitropismo y de la arquitectura de la raíz.
- El protocolo de aclimatación permitió establecer un 45 % de supervivencia en la trasferecia de cultivo *in vitro* a condiciones *ex vitro*.

8. Referencias

Adame J y Adame H. Plantas cultivadas del noreste mexicano: Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas y altiplano Potosino. ED. Castillo, Monterrey, Nuevo León; México. **2000**.

Arnold JEM y Jongma J. Fuel wood and charcoal in developing countries: an economics survey. *Unasylva*, **1978**; 118:2-9.

Beck SL y Dunlop RW. Micropropagation of the acacia species—a review. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. **2001**;37:531–538.

Beck SL, Dunlop R y Van Standen J. Rejuvenation and micropropagation of adult *Acacia mearnsii* using coppice material. *Plant Growth Regulation*. **1998**;26:149–153.

Bhat, S. R., y Chandel, K. P. S. A novel technique to overcome browning in tissue culture. *Plant Cell Reports*. **1991**;10:358-361.

Dewan, A, Nanda K, Gupta SC. In vitro micropropagation of *Acacia nilotica* subspecies indica Brenan via cotyledonary nodes. *Plant Cell Reports*. **1992**;12:18-21.

Duclercq J, Sangwan BN, Manuella C y Rajbir SS. *De novo* shoot organogenesis: from art to science. *Trends in Plant Science*. **2011**;16:507-606.

Dzowela BH. *Acacia angustissima*: a central American tree that's going places. *Agroforestry Today*. **1998**;13-14.

Geoger AF, Hall MA, Geert-jan de K. *Plant propagation by tissue culture*. Tercera edición. Holanda. Editorial Springer. **2008**;501.

Hove L, Topps JH, Sibanda S, Ndlovu LR. Nutrient intake and utilisation by goats fed dried leaves of the shrub legumes *Acacia angustissima*, *Calliandra calothyrsus* y

Leucaena leucocephala as supplements to native pasture hay: Animal Feed Science and Technology. 2001;95-106.

Ikeuchi, M., Sugimoto, K., y Iwase, A. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. The Plant Cell. **2013**:1-15.

Kwesiga F, Akinnifesi FK, Mafongoya PL, McDermott MH y Agumya A. Agroforestry research and development in southern Africa during the 1990s: review and challenges ahead. Agroforestry systems. **2003**;59:173-186.

Loyola-Vargas VM y Vazquez-Flota F. Plant cell culture. Segunda edición. Yucatan, México. Editorial Humana Press.**2006**;392.

Martínez M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica, México. **1994**.

Moshkov IE, Novicova GV, Hall MA y George EF. Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. En: Geoger AF, Hall MA, Geert-jan de K. Plant propagation by tissue culture. Holanda. Editorial Springer.**2008**:227-282.

Murashige T y Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. **1962**;12:473-97.

Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R y Simons A. Agroforestry Database: a tree reference and selection guide.**2009**.

Perilli S, Moubayidin L y Sabatini S. The molecular basis of cytokinin function. Current Opinion in Plant Biology. **2010**;13:21–26.

Piqueras, A., Albuquerque, N. y Folta, K. M. Explants Used for the Generation of Transgenic Plants. In Transgenic Crop Plants. Springer. Berlin Heidelberg.**2010**

SEMARNAT. Catálogo de especies con usos de especies no maderables en bosques subtropicales y subtropicales de Durango, Chihuahua, Jalisco,

Michoacán, Oaxaca y Guerrero. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Mexico. **2003**.

Shahinozzaman M, Azad MAK y Amin MN. *In Vitro* Clonal Propagation of a Fast Growing Legume Tree-*Acacia mangium Willd.* Employing Cotyledonary Node Explants. *Notulae Scientia Biologicae*. **2012**;2:79-85.

Thorpe TA. History of plant tissue culture. *Mol Biotechnol*. **2007**;37:169–180.

Vanneste S y Friml J. Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell*. **2009**;136:1005-1016.

Vasil IK. A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*. **2008**;27:1423-1440.

Vengadesan G, Ganapathi A, Anad RP y Anbazhagan VR. In vitro organogenesis and plant formation in *Acacia sinuata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **2000**;61:23–28.

Vengadesan G, Ganapathi A, Amutha S y Selvarj N. High-frequency plant regeneration from cotyledon callus of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. **2003**;39:28–33.

Vieten A, Sauer M, Brewer PB y Friml J. Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends in Plant Science*. **2007**;12:160-168.

Yepes LM y Aldwinckle HS. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **1994**;37:257-269.

Zhao, X. Y., Su, Y. H., Cheng, Z. J. y Zhang, X. S. Cell fate switch during in vitro plant organogenesis. *Journal of Integrative Plant Biology*, **2008**;50:816-824.

9. Anexos

Abreviaturas:

‰: porcentaje

µM: micro molar

2,4-D: ácido diclorofenoxiacético

4-Cl-AIA: ácido cloro indol acético

AG₁: ácido giberelico 1

AG₃: ácido giberelico 3

AIA: ácido indol acético

AIB: ácido indol butírico

ANA: ácido naftalenacético

BAP: bencil amino purina

CFB: coeficiente formador de brotes

CIN: cinetina

cm: centímetro

CTV: cultivo de tejidos vegetales

g/L: gramo por litro

g: gramo

L: litro

mg/L: miligramos por litro

MIB: medio inductor de brotes

MIC: medio inductor de callo

mm: milímetro

MS: medio Murashige y Skoog

p/v: peso por volumen

pH: potencial de hidrogeno

RCV: reguladores de crecimiento vegetal

T: tratamiento

v/v: volumen por volumen

A continuación se presentan la metodología de preparación de medios de cultivo utilizados en este trabajo.

Medio de cultivo:

Medio MS para germinación de semillas de *Acacia angustissima*.

MS en polvo Sigma	4.4 g/L
Sacarosa	30 g/L
Phytigel	3 g/L

Se adicionan las cantidades de medio MS, sacarosa en un matraz. Posteriormente se colocan dos terceras partes de agua para disolver las sales y sacarosa. Finalizado esto se ajusta el pH a 5.8 con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N. Después se adiciona el agente gelificante y se calienta el medio para asegurar que este se mezcle perfectamente. Se afora al volumen final y el medio es colocado en frascos de cultivo a razón de 20 ml por cada uno, se les coloca una tapa, para ser esterilizados por presión en autoclave a 121°C y 15 psi.

Medio para la selección del explante.

MS en polvo Sigma	4.4 g/L
Sacarosa	30 g/L
Phytigel	3 g/L
BAP	0.5 µl/L
2,4-D	1 ml/L

Se adicionan las cantidades de medio MS, sacarosa y RCV en un matraz. Posteriormente se colocan dos terceras partes de agua para disolver las sales, sacarosa y RCV. Finalizado esto se ajusta el pH a 5.8 con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N. Después se adiciona el agente gelificante y se calienta el medio para asegurar que este se mezcle perfectamente. Se afora al volumen final y es esterilizado por presión en autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 minutos. El medio estéril se coloca en cajas de petri a razón de 20 ml por cada una, este proceso se lleva a cabo en la campana de flujo laminar para mantener aséptico el medio. Se almacena hasta su uso a 4°C en el refrigerador.

Medios de inducción de callo

MS en polvo Sigma	4.4 g/L
Sacarosa	30 g/L
Phytigel	3 g/L
Tratamiento 1	
BAP	0.5 ml/L
2,4-D	0.5 ml/L
Tratamiento 2	
BAP	0.5 ml/L
2,4-D	1 ml/L
Tratamiento 3	
BAP	0.5 ml/L
2,4-D	1.5 ml/L
Tratamiento 4	
BAP	0.5 ml/L

2,4-D	2 ml/L
Tratamiento 5	
BAP	1 ml/L
2,4-D	0.5 ml/L
Tratamiento 6	
BAP	1 ml/L
2,4-D	1 ml/L
Tratamiento 7	
BAP	1 ml/L
2,4-D	1.5 ml/L
Tratamiento 8	
BAP	1 ml/L
2,4-D	2 ml/L
Tratamiento 9	
CIN	0.5 ml/L
2,4-D	0.5 ml/L
Tratamiento 10	
CIN	0.5 ml/L
2,4-D	1 ml/L
Tratamiento 11	
CIN	0.5 ml/L
2,4-D	1.5 ml/L
Tratamiento 12	
CIN	0.5 ml/L
2,4-D	2 ml/L
Tratamiento 13	
CIN	1 ml/L
2,4-D	0.5 ml/L
Tratamiento 14	
CIN	1 ml/L
2,4-D	1 ml/L
Tratamiento 15	
CIN	1 ml/L
2,4-D	1.5 ml/L
Tratamiento 16	
CIN	1 ml/L
2,4-D	2 ml/L

Se adicionan las cantidades de medio MS, sacarosa y RCV correspondiente a cada tratamiento en un matraz. Posteriormente se colocan dos terceras partes de agua

destilada para disolver las sales, sacarosa y RCV. Finalizado esto se ajusta el pH a 5.8 con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N. Después se adiciona el agente gelificante y se calienta el medio para asegurar que este se mezcle perfectamente. Se afora al volumen final y es esterilizado por presión en autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 minutos. El medio estéril se coloca en cajas de petri a razón de 20 ml por cada una, este proceso se lleva a cabo en la campana de flujo laminar para mantener aséptico el medio. Se almacena hasta su uso a 4°C en el refrigerador.

Medio de inducción de brotes

MS en polvo Sigma	4.4 g/L
Sacarosa	30 g/L
Phytigel	3 g/L
Tratamiento 1	
BAP	0.68 ml/L
ANA	0 ml/L
Tratamiento 2	
BAP	0.9 ml/L
ANA	0 ml/L
Tratamiento 3	
BAP	1.12 ml/L
ANA	0 ml/L
Tratamiento 4	
BAP	1.34 ml/L
ANA	0 ml/L
Tratamiento 5	
BAP	0.68 ml/L
ANA	0.07 ml/L
Tratamiento 6	
BAP	0.9 ml/L
ANA	0.07 ml/L
Tratamiento 7	
BAP	1.12 ml/L
ANA	0.07 ml/L
Tratamiento 8	
BAP	1.34 ml/L
ANA	0.07 ml/L

Tratamiento 9	
BAP	0.68 ml/L
ANA	0.148 ml/L
Tratamiento 10	
BAP	0.9 ml/L
ANA	0.148 ml/L
Tratamiento 11	
BAP	1.12 ml/L
ANA	0.148 ml/L
Tratamiento 12	
BAP	1.34 ml/L
ANA	0.148 ml/L
Tratamiento 13	
BAP	0.68 ml/L
ANA	0.223 ml/L
Tratamiento 14	
BAP	0.9 ml/L
ANA	0.223 ml/L
Tratamiento 15	
BAP	1.12 ml/L
ANA	0.223 ml/L
Tratamiento 16	
BAP	1.34 ml/L
ANA	0.223 ml/L

Se adicionan las cantidades de medio MS, sacarosa y RCV correspondiente a cada tratamiento en un matraz. Posteriormente se colocan dos terceras partes de agua destilada para disolver las sales, sacarosa y RCV. Finalizado esto se ajusta el pH a 5.8 con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N. Después se adiciona el agente gelificante y se calienta el medio para asegurar que este se mezcle perfectamente. Se afora al volumen final y es esterilizado por presión en autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 minutos. El medio estéril se coloca en cajas de petri a razón de 20 ml por cada una, este proceso se lleva a cabo en la campana de flujo laminar para mantener aséptico el medio. Se almacena hasta su uso a 4°C en el refrigerador.

Medio para rizogénesis

MS en polvo Sigma	4.4 g/L
Sacarosa	30 g/L
Phytigel	3 g/L
Tratamiento 1	ANA 0 μ M
Tratamiento 2	ANA 2.22 μ M
Tratamiento 3	ANA 5.07 μ M
Tratamiento 4	ANA 8.04 μ M
Tratamiento 5	ANA 9.07 μ M

Se adicionan las cantidades de medio MS, sacarosa y RCV en un matraz. Posteriormente se colocan dos terceras partes de agua destilada para disolver las sales y sacarosa. Finalizado esto se ajusta el pH a 5.8 con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N. Después se adiciona el agente gelificante y se calienta el medio para asegurar que este se mezcle perfectamente. Se afora al volumen final y el medio es colocado en frascos de cultivo a razón de 20 ml por cada uno, se les coloca una tapa, para ser esterilizados por presión en autoclave a 121°C y 15 psi.