



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE
REGENERACIÓN *in vitro* DE CEMPAXÚCHITL (*Tagetes
erecta*) VÍA ORGANOGÉNESIS INDIRECTA”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JESÚS AGUSTÍN GARCÍA RAMÍREZ

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 CEMPAXÚCHITL (*Tagetes
erecta*) VÍA ORGANOGÉNESIS INDIRECTA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JESÚS AGUSTÍN GARCÍA RAMÍREZ

DIRIGIDA POR

Dr. ANDRÉS CRUZ HERNÁNDEZ

SINODALES

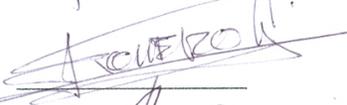
Dr. ANDRÉS CRUZ HERNÁNDEZ
DIRECTOR

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 CEMPAXÚCHITL (*Tagetes erecta* L.) VÍA ORGANOGÉNESIS INDIRECTA”** fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Microbiología del Campus Aeropuerto de la Universidad Autónoma de Querétaro bajo la asesoría del Dr. Andrés Cruz Hernández.

AGRADECIMIENTOS:

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la elaboración y culminación de este trabajo a través del proyecto de ciencia básica “Análisis molecular del nopal con énfasis en el desarrollo en el fruto (clave 134953)”.
- Al Fondo de Fortalecimiento a la Investigación Universidad Autónoma de Querétaro (FOFI-UAQ) por financiar este trabajo a través del proyecto: “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
ABREVIATURAS	
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> (CTV)	1
1.2 Principales aspectos para establecer un CTV	1
1.2.1 La Selección del explante	1
1.2.2 El estado fisiológico de la planta que dona el explante	2
1.2.3 Factores físicos (Condiciones ambientales)	2
1.3 Medios de cultivo	3
1.4 Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)	7
1.5 Morfogénesis	11
1.5.1 Proceso de desdiferenciación <i>in vitro</i>	11
1.5.2 Embriogénesis somática	13
1.5.3 Organogénesis vegetal	15
1.6 Pasos para establecer un sistema de regeneración vía organogénesis indirecta	21
1.7 Aplicaciones del CTV	24
1.8 Modelo de estudio : Cempaxúchitl	25
1.8.1 Descripción botánica	25
1.8.2 Distribución e importancia económica	25
1.8.2.1 Distribución	25
1.8.2.2 Importancia económica	26

1.8.3 Producción	27
1.9 Antecedentes del CTV en cempaxúchitl	29
2. HIPÓTESIS	31
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo General	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4. METODOLOGÍA	33
4.1 Material vegetal	33
4.2 Métodos	33
4.2.1 Desinfección de las semillas	33
4.2.2 Germinación <i>in vitro</i> de semillas	33
4.2.3 Selección del explante	34
4.2.4 Inducción del proceso de desdiferenciación <i>in vitro</i>	35
4.2.5 Producción de brotes	36
4.2.6 Elongación y enraizamiento	36
4.2.7 Ensayo de enraizamiento directo <i>in vitro</i>	37
4.2.8 Aclimatación	37
4.3 Diseño experimental	38
5. RESULTADOS	39
5.1 Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	39
5.2 Selección del explante	40
5.3 Producción de callos	42
5.4 Producción de brotes	45
5.5 Ensayo de enraizamiento directo <i>in vitro</i>	47
5.6 Elongación y enraizamiento	49
5.7 Ensayo de aclimatación <i>ex vitro</i>	50
6. DISCUSIÓN	53
7. CONCLUSIÓN	57
8. REFERENCIAS	58
ANEXOS	68

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Composición de los medios de cultivo comúnmente utilizados	6
2. Combinación de tratamientos de 2,4-D y BAP para la inducción de callos	35
3. Combinaciones de AIA y BAP para la producción de brotes	36
4. Calendario de fertilización de plántulas regeneradas	37
5. Efecto de los tratamientos de desinfección sobre la germinación de semillas de cempaxúchitl	39
6. Efecto de BAP y 2,4-D en la inducción y naturaleza del callo en diferentes explantes de cempaxúchitl	41
7. Selección del explante en base a la CFB bajo una combinación de BAP y ANA	41
8. Efecto de diferentes combinaciones de BAP y 2,4-D sobre la formación de callos en explantes foliares	43
9. Efecto de las combinaciones de BAP y AIA sobre la formación de brotes en explantes foliares	46
10. Efecto de concentraciones de AIB sobre la formación de raíces <i>de novo</i> en plántulas de cempaxúchitl	47
11. Efecto del método de aclimatación <i>ex vitro</i> en la sobrevivencia de plántulas <i>in vitro</i>	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Funciones principales de los RCV más empleados en el CTV	10
2. Efecto de auxinas y citocininas en el destino celular y morfogénesis en explantes cultivados <i>in vitro</i>	20
3. Etapas del establecimiento de un sistema de regeneración vía organogénesis indirecta	23
4. Variedades de cempaxúchitl	28
5. Aspecto de brotes inducidos con BAP 4.4 μM y ANA 2.7 μM a partir de callos procedentes de explantes foliares	42
6. Inducción de callo en explantes foliares cultivados con 2,4-D 6.74 μM y BAP 2.2 μM en los días 1, 5, 7 y 13 respectivamente	44
7. Formación de raíces <i>de novo</i> en plántulas de cempaxúchitl en medio MS libre de hormonas	48
8. Formación de raíces <i>de novo</i> en plántulas de cempaxúchitl en medio MS suplementado con AIB	48
9. Aspecto de una plántula regenerada a partir de brotes inducidos bajo la combinación de BAP 6.6 μM y AIA 8.5 μM en explantes foliares de cempaxúchitl	49
10. Aspecto de plántulas de cempaxúchitl desarrolladas <i>in vitro</i> aclimatadas a condiciones <i>ex vitro</i>	51
11. Resumen del sistema de regeneración obtenido	52

ABREVIATURAS

%	porcentaje
°C	grados centígrados
2,4-D	ácido 2,4-Dicloro-fenoxi-acético
AAB	ácido abscísico
ADN	ácido desoxirribonucleico
AG ₁	ácido giberélico 1
AG ₃	ácido giberélico 3
AG ₄	ácido giberélico 4
AIA	ácido indol-acético
AIB	ácido indol-butírico
ANA	ácido naftalen-acético
ARN	ácido ribonucleico
Aux	auxina
BAP	bencil amino-purina
CFB	Capacidad formadora de brotes
CIN	Cinetina
Cit	Citocinina
cm	centímetros
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
g	gramos

GA	Giberelinas
h	hora
kg	kilogramos
L	Litros
lts	litros
M	molar
mg	miligramos
min	minuto
mL	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
MS	medio Murashige y Skoog
ng	nanogramos
psi	libras sobre pulgada al cuadrado
RCV	reguladores de crecimiento vegetal
TDZ	tidiazurón
µg	microgramos
µL	microlitros
µM	micromolar

RESUMEN.

El cempaxúchitl es una asterácea que en México tiene una importancia ceremonial, pero también tiene una creciente demanda industrial ya que se emplea como alimento pigmentante de peces, crustáceos y aves de corral, debido a que tiene un alto contenido de carotenoides, particularmente de luteína. En este trabajo se logró la regeneración de plantas de cempaxúchitl vía organogénesis usando explantes foliares. Se tomaron segmentos de hojas, de aproximadamente de 0.25 cm², a partir de plántulas de tres semanas de edad fisiológica desarrolladas *in vitro*. Estos explantes se cultivaron en medio MS suplementado con diferentes combinaciones de bencil-aminopurina (BAP) y ácido indol-acético (AIA). Los valores más altos de regeneración se obtuvieron con la combinación de BAP 6.6 µM y AIA 8.5 µM a los trece días de exposición de los explantes con el medio. Se determinó que el medio MS libre de fitohormonas es suficiente para que los brotes se desarrollen y formen su sistema radicular de forma normal.. En un experimento alterno probando diferentes combinaciones de BAP y 2,4-D, se estableció el cultivo celular a partir de explantes foliares. Los valores más altos de frecuencia de formación de callo se obtuvieron con la combinación de BAP 2.2 µM y 2,4-D 6.74 µM. Los callos obtenidos eran friables y no presentaban signos de oxidación. Se diseñó un método de aclimatación *ex vitro* que asegura la sobrevivencia del 80% de plántulas desarrolladas *in vitro*.

1. ANTECEDENTES.

1.1 Cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (CTV).

El cultivo de tejidos *in vitro* (CTV), es un conjunto de técnicas, que consisten esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario adoptar medidas de asepsia para evitar la contaminación microbiana (Mroginski y Roca, 1991)

El CTV se basa en la regeneración somática de las plantas, la cual tiene su fundamento en el principio de totipotencialidad descrito por Haberlandt en 1902 y en la hipótesis sugerida por Skoog y Miller en 1957 acerca del balance hormonal; los cuales en conjunto señalan que toda célula vegetal es capaz de regenerar un nuevo individuo con características idénticas a la planta de la cual procede esa célula (George y col., 2008).

1.2 Principales aspectos para establecer un CTV.

1.2.1 La selección del explante.

Un explante es una parte de un tejido u órgano vegetal que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo. El explante debe responder eficientemente a las condiciones *in vitro* y es importante considerar el hecho de que el aislamiento de un tejido u órgano del resto de la planta provoca un estrés que altera su metabolismo celular, y en forma importante, su balance hormonal. Un buen explante es aquel que sobrevive en una proporción elevada bajo las condiciones *in vitro*. El tamaño del explante no tiene una influencia aparente, salvo cuando se desea obtener plantas libres de virus y se emplean meristemos (sin primordios) foliares los cuales presentan una elevada probabilidad de diferenciar plantas libres de estos patógenos (Villalobos y Thorpe, 1991). El explante crece y se multiplica por la formación de masas de células desdiferenciadas con apariencia amorfa y

proliferación continua conocidas como callos (Ramos, 2007), o bien por la inducción directa de brotes, embriones o raíces, según las condiciones del cultivo. Aun cuando técnicamente cualquier tejido sea capaz de responder al tratamiento que se le exponga, los explantes más comúnmente usados son: semillas, embriones, cotiledones, órganos reproductores o segmentos de tejido vegetativo como hoja, tallo o raíz (Ammirato, 1985).

1.2.2 El estado fisiológico de la planta que dona el explante.

Éste influye considerablemente en su capacidad morfogénética. Se ha encontrado por ejemplo, que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen con plantas con diferente edad fisiológica (Styer y col., 1983). A sí mismo, se ha observado que la edad fisiológica del explante, tiene gran influencia en la morfogénesis ya que mientras más joven y menos diferenciado este el tejido a cultivar mejor será la respuesta *in vitro* (Villalobos y col., 1982).

1.2.3 Factores físicos (Condiciones ambientales).

La luz y temperatura son los factores físicos más extensivamente estudiados en el cultivo de tejidos. Las cámaras o cuartos de crecimiento permiten controlar la luz asignando un fotoperiodo, tipo e intensidad luminosa y establecer una temperatura de incubación; parámetros que pueden ser constantes o fluctuar respecto al tiempo de manera automatizada, con el propósito de encontrar las condiciones ambientales óptimas para una respuesta eficiente del cultivo *in vitro*. Generalmente la temperatura de incubación para el CTV de la mayoría de especies vegetales oscila entre los 24 a 28°C y el fotoperiodo es de 16 horas de luz y 8 horas oscuridad (Chee y col., 1982).

1.3 Medios de cultivo.

La elección del medio de cultivo también es un aspecto importante a definir al establecer un sistema de CTV, ya que este debe proveer al cultivo todos los nutrientes necesarios para su desarrollo en la forma, combinación y concentración requerida, como también proveer un soporte físico de acuerdo al tipo de respuesta esperada (Huang y Murashige, 1972).

Los componentes de un medio de cultivo suelen estar clasificados de la siguiente forma:

- a) Mezcla de sales minerales: Incluyen los elementos mayores o macronutrientes (N, P, K) y elementos menores o micronutrientes (S, Fe, Zn, Mg, Cu, entre otros) esenciales para el desarrollo de las plantas.
- b) Compuestos orgánicos, de entre los cuales se encuentran:
 - Una fuente de energía a base de carbohidratos de los cuales el más usado es la sacarosa (2-3%) y ocasionalmente la fructosa y la glucosa también son empleados. Estos componentes juegan el rol de fuente de carbono para la planta ya que bajo condiciones *in vitro* no pueden fijar CO₂.
 - Vitaminas (opcional): La tiamina es la única vitamina que tiene una importancia consistente con el CTV aun que adicionalmente se utilizan otras como riboflavina, ácido ascórbico, biotina, ácido fólico y ácido nicotínico; los cuales pueden estimular procesos específicos del crecimiento.
 - Aminoácidos (opcional): Los aminoácidos más frecuentemente utilizados por sus efectos beneficiosos son la L-arginina, L-aspártico, ácido L-glutámico, L-glutamina y L-glicina. La L-serina aparentemente juega un papel importante en la formación de embriones haploides en el cultivo de anteras, mientras que la L-tirosina es un componente crítico para la diferenciación de los brotes en el cultivo de callos.

- Reguladores de crecimiento vegetal (RCV) o fitohormonas: Es un conjunto de sustancias orgánicas naturales o sintéticas que a bajas concentraciones presentan influencia en procesos fisiológicos como el crecimiento, morfogénesis y desarrollo de la planta.
 - Agentes antioxidantes: Los más comúnmente utilizados son el inositol y mio-inositol aunque también son utilizados otros agentes como el ácido cítrico, citrato, ácido ascórbico y el ácido málico los cuales estimulan el efecto de antioscurecimiento.
- c) Preparaciones de complejos (suplementos) naturales: Una variedad de preparaciones de composición indefinida han sido utilizadas para enriquecer los diferentes medios de cultivo. A menudo, estas preparaciones se utilizan como último recurso, después de que todos los ingredientes definibles han fallado para el establecimiento del CTV, esto ocurre principalmente en plantas recalcitrantes al cultivo de tejidos como el chile y algunas especies leñosas. Sin embargo, muchas de estas preparaciones poseen efectos estimulantes del crecimiento que destacan sobre lo que se pueda lograr con medios químicamente definidos, por lo que estos se incluyen como suplemento. Se sabe que la pulpa de plátano y emulsión de pescado son suplementos obligados para el medio de cultivo para orquídeas; también se sabe que los hidrolizados de proteínas proveen de aminoácidos al medio y que el zumo de naranja provee de ácido ascórbico y ácido cítrico además de otros componentes no identificados que promueven el crecimiento del tejido en el medio. Otras preparaciones como el agua de coco, el extracto de malta, el extracto de levadura y jugo de tomate se sabe que poseen un efecto sobre el crecimiento y ganancia de biomasa del tejido, debido a que aportan al medio diversos agentes estimulantes del crecimiento (Huang y Murashige, 1972; George y col., 2008).

Actualmente existen diversos medios de cultivo, algunos específicos para un tipo de tejido o especie vegetal, otros se utilizan de manera generalizada para todo tipo de tejidos y especies vegetales ya que tienen una composición química

definida que suministra al cultivo todos los componentes antes mencionados con variaciones en la forma y concentración de los nutrientes. El medio más comúnmente utilizado para el CTV es el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), otros ejemplos son el medio B5 (Gamborg y col., 1976) y el medio White (Núñez y Ochoa, 1999). En el cuadro 1 se muestran los componentes principales de los medios de cultivo.

El material vegetal puede ser cultivado en un medio líquido o en medio semisólido al cual se le ha adicionado un agente gelificante. El método a desarrollar depende del tipo de cultivo que se desee establecer y del objetivo que se persiga.

Los medios semisólidos son ampliamente utilizados para el establecimiento de explantes, para el cultivo rutinario de grandes cantidades de callos u órganos vegetales y para el mantenimiento de cultivos a largo plazo. El agar es el agente solidificante más utilizado, pero existen otros que también son ampliamente empleados como el fitagel, gel-rite o goma gelano. Los cultivos que crecen en medios semisólidos permanecen en estáticos en contenedores de vidrio o plástico que ocupan poco espacio. La superficie de contacto entre el explante y el medio es reducida por lo que puede haber gradientes de nutrientes y un intercambio entre el medio y el explante de factores de crecimiento y productos de desecho procedentes del metabolismo.

Los medios líquidos son esenciales para el cultivo de células en suspensión, y se prefieren para los experimentos críticos para la nutrición, el crecimiento y la diferenciación celular en el callo. También se han utilizado en algunos trabajos de micropropagación, cuando se trata de órganos muy pequeños como las anteras que son capaces de flotar en el líquido o en el caso de los protoplastos que se pueden cultivar en capas poco profundas de líquido estático siempre y cuando haya una difusión gaseosa adecuada. Otros fines de los medios de cultivo líquidos, es cuando se desea recuperar metabolitos secundarios o la conversión de algún sustrato por parte del tejido. El cultivo en medio líquido se desarrolla en biorreactores donde se tienen que estandarizar parámetros adicionales a los de un

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo de tejidos comúnmente utilizados

Compuestos	Murashige y Skoog	Gamborg (B5)	White
Macronutrientes (mg/L)			
KNO ₃	1900	2500	80
NH ₄ NO ₃	1650	-	-
NH ₄ SO ₄	-	134	-
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	-
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	-	285
CaCl ₂ ·2H ₂ O	332.2	150	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	250	740
KCl	-	-	65
KH ₂ PO ₄	170	-	-
Na ₂ SO ₄	-	-	200
NaH ₂ PO ₄	-	130.5	16.5
Micronutrientes μM			
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9	10	7
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	2	2.67
H ₃ BO ₃	6.2	3	1.5
KI	0.83	0.75	0.75
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025	0.01
NaMoO ₃	-	-	0.001
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	2.5
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	-
Orgánicos μM			
Mio-inositol	100	100	-
Glicina	2	-	3
Acido Nicotínico	0.5	1	0.5
Piridoxina HCl	0.5	1	0.1
Tiamina HCl	0.1	10	0.1

cultivo en medio semisólido como lo es: una agitación adecuada que asegure una distribución uniforme de los nutrientes en el medio y que evite que las células o tejidos se sedimenten en el medio, un método de aireación adecuado que evite la anoxia en el cultivo y un sistema de recambio o recirculación del medio eficiente (George y col., 2008).

1.4 Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)

Son sustancias de origen orgánico, que a bajas concentraciones presentan influencia sobre los procesos fisiológicos de la planta. Los procesos influenciados consisten principalmente en el crecimiento, diferenciación y desarrollo; además otros procesos como el movimiento estomático pueden ser influenciados. Los RCV también han sido nombrados como fitohormonas pero este término es poco utilizado (Davies, 2010).

Los RCV más empleados en el CTV se clasifican en cinco grupos:

- Auxinas
- Citocininas
- Giberelinas
- Etileno
- Ácido absícico

Pero también otras sustancias como jazmonatos, salicilatos, brasinólidas, poliaminas, estrigolactonas y pequeños péptidos han sido catalogadas como RCV.

a) Auxinas

Son compuestos que se derivan del triptófano o del indol-glicerol fosfato (IGP), se sintetizan mayormente en los ápices y son distribuidos a toda la planta a partir de dos vías: la vías largas cuando las auxinas, son transportadas desde su sitio de síntesis, es decir, a partir de brotes jóvenes hacia las raíz a través del floema y la

segunda vía que es el transporte célula-célula, la cual esta mediada por acarreadores específicos de auxinas como las proteínas PIN y AUX (Saini y col., 2013).

Las auxinas son considerados como el regulador maestro en plantas, le da polaridad e influye en el destino celular, acidifica la pared celular y promueve el alargamiento de la célula; regula la arquitectura de los meristemos y por consiguiente la arquitectura de la parte vegetativa y del sistema radicular en plantas intactas. En el CTV se utiliza para la inducción de callos, embriogénesis somática y formación de raíces (Vanneste, 2009). La auxina natural más frecuentemente utilizada en el CTV es el ácido indol-acético (AIA) y las sintéticas son el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido indol-butírico (AIB).

b) Citocininas

Se sintetizan a partir de la adenina por sustitución de un isopreno o una cadena lateral aromática en la posición N⁶. Los patrones de la expresión de los genes IPT indican que las citocininas son producidas en varios sitios en la planta incluyendo raíces, brotes y semillas inmaduras (Moubayidin y col., 2009).

Estas hormonas influyen en numerosos aspectos fisiológicos en plantas intactas como la germinación de la semilla, de-etiolación, diferenciación de cloroplastos, promueven el crecimiento de yemas axilares, influyen en el desarrollo de flores y frutos, participan en las interacciones planta-patógeno, retardan la senescencia foliar. Enfoques bioquímicos, genéticos y moleculares han permitido descubrir otras funciones de las citocininas como la proliferación y diferenciación celular, la nodulación, transporte de nutrientes minerales a través del xilema y fotosintatos por el floema, regulan los ciclos circadianos y la transición de meristemo apical a meristemo floral. La diversidad y especificidad de patrones de expresión de los genes que regulan la biosíntesis de citocininas sugiere que también participa en la formación de óvulos, embriones, raíces laterales y formación de venas florales. En cultivos celulares promueve la división y proliferación celular, induce la formación

de brotes en los explantes y participa en la rediferenciación de los callos a brotes (Haberer y Kieber, 2002; Hwan y col., 2012).

c) Giberelinas (GAs)

Las giberelinas son hormonas vegetales derivadas de los diterpenos que se sintetizan en proplastidios, células meristemáticas, anteras en desarrollo y en la punta de la raíz a partir del geranil-geranil difosfato (GGDP) que es el precursor común de 20 carbonos. Se requieren tres tipos de enzimas para la biosíntesis de giberelinas activas a partir de GGDP, las cuales son: terpeno sintetasas, monoxigenasas del citocromo P450 y dioxigenasas 2-oxoglutarato-dependientes (Yamaguchi, 2008).

Las giberelinas regulan diversos aspectos del desarrollo y crecimiento en plantas intactas tales como la formación y germinación de semillas, promueve la expansión de las hojas, induce el alargamiento de tallos y frutos, induce floración y retrasa la maduración de los frutos. En el CTV se utiliza para la elongación de los brotes y para inhibir la formación de raíces adventicias. Se han identificado más de un centenar de estas fitohormonas en plantas, de las cuales, solo unas pocas como el AG1, y AG4 son biológicamente activas. La giberelina más comúnmente utilizada en el CTV es el AG3 (Weis y Ory, 2007; Yamaguchi, 2008).

d) Etileno

El etileno regula una multitud de procesos fisiológicos en la planta, que van desde la germinación de la semilla hasta la maduración de los frutos. Tiene particular importancia económica debido a que se utiliza en la agricultura como inductor de la maduración de los frutos. El etileno es un alqueno que se sintetiza a partir de L-Metionina a través del ácido 1-aminoáciclopropano-1-carboxílico (ACC). Las enzimas que catalizan las dos reacciones en estas vías son la ACC sintasa y ACC oxidasa. Las señales ambientales y endógenas regulan la biosíntesis de etileno principalmente a través de la expresión diferencial de genes de ACC sintasa (Biddington, 1992).

En términos más amplios, el etileno provoca la senescencia de órganos en la planta, induce efectos morfogenéticos durante el estrés biótico o abiótico, participa en la abscisión de flores y frutos, junto con las auxinas promueve la dominancia apical, induce la formación de raíces adventicias y participa en las interacciones patógeno-hospedero (Bleecker, 2000; Broekaert y col., 2006)

En el CTV de manera general a altas concentraciones puede favorecer un proceso mientras que a altas concentraciones tiene un efecto inhibitorio.

e) **Ácido absícico (ABA)**

Pertenece a una clase de metabolitos denominados isoprenoides. Se sintetiza principalmente en tejidos vasculares como lo son las células del parénquima y las células acompañantes del floema y xilema; particularmente por escisión de las xantófilas como la 9'-cis-Neoxantina y 9'-cis-Violaxantina (Nambara y Marian-Poll, 2005).

El ABA regula numerosos procesos de desarrollo y adaptación al estrés en plantas intactas. Controla el movimiento estomático, induce senescencia y abscisión foliar; inhibe la germinación, floración y elongación de las raíces, por lo que se considera que tiene un efecto antagónico al producido por giberelinas (Cutler y col., 2010). En embriogénesis somática promueve la correcta maduración del embrión inhibiendo la germinación de embriones inmaduros.



Figura 1. Funciones principales de los RCV más empleados en el CTV.

1.5 Morfogénesis.

La morfogénesis se refiere al tipo de diferenciación a la que se somete un explante y esta se puede lograr a través de dos vías independientes embriogénesis somática u organogénesis. Las relaciones que conducen a la morfogénesis entre el medio de cultivo y el explante son complejas, aunque de manera general la composición y proporción de reguladores de crecimiento se manipulan para optimizar la calidad y un buen porcentaje de embriones u órganos inducidos. Tanto embriogénesis somática como organogénesis pueden ser directas cuando se inducen a partir del propio explante e indirectas cuando el explante pasa por un estadio intermedio de desdiferenciación denominado callo y a partir de estas estructuras se induce la morfogénesis (Sugimoto y col., 2011).

1.5.1 Proceso de desdiferenciación *in vitro*.

Las plantas desarrollan masas de células desorganizadas como callos y tumores en respuesta a diversos estímulos bióticos y abióticos. Desde el descubrimiento histórico de dos hormonas estimulantes del crecimiento, auxinas y citocininas, inducen la formación de callos a partir de explantes vegetales cultivados *in vitro*, este sistema experimental se ha utilizado ampliamente en la investigación básica y aplicaciones en cultivos hortícolas y ornamentales (Ikeuchi y col., 2013).

La elevada plasticidad para la diferenciación celular es una característica central en las células vegetales. Las plantas generan masas de células no organizadas, como callos o tumores, en respuesta al estrés, como lo es la infección por heridas o enfermedades. De manera natural la formación de callos en especies de árboles maderables se ha descrito desde hace más de 200 años (Neely, 1979).

El término “callo” se origina del latín “callum”, que significa duro y en medicina este término es empleado para describir el engrosamiento del tejido dérmico. Hoy en día, la misma palabra es empleada en fisiología vegetal, para

describir masas amorfas de células desorganizadas que se encuentran en crecimiento y proliferación continua (Ikeuchi y col., 2013).

El callo se puede producir a partir de una sola célula diferenciada, y muchas células del callo son totipotentes, siendo capaces de regenerar todo el cuerpo de la planta (Steward y col., 1958; Nagata y Takebe, 1971). Bajo ciertas condiciones, a partir de callos se puede inducir la formación de embriones somáticos (Steward y col., 1958). Por lo tanto, se cree que en algunos casos, la formación de callos involucra la desdiferenciación celular. Sin embargo, se ha reconocido que los callos son muy diversos y se pueden clasificar en subgrupos basados en sus características macroscópicas. Por ejemplo algunos callos son masas celulares compactas y duras, con células intimamente unidas, mientras que otros forman tejidos esponjosos, con una gran cantidad de espacios intercelulares, característica conocida como friabilidad (Ramos, 2007). El tipo y grado de pigmentación del callo está marcado tanto por factores ambientales como nutricionales y se manifiesta por la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas, entre otros (Hurtado y Merino, 1987). Cuando los callos muestran diversos grados de diferenciación como la formación de brotes o raíces a estos se les denomina callo organogénico y cuando se induce la formación de masas proembriónicas o embriones somáticos es denominado callo embrionario (Ikeuchi y col., 2013). También se sabe que diferentes tipos de callos en *Arabidopsis thaliana* tienen perfiles de expresión génica distintos (Iwase y col., 2011). Por lo tanto en las células del callo hay diversos grados de diferenciación.

Después de descubrir que los callos se podían producir artificialmente *in vitro* (Gautheret, 1939; Nobécourt, 1939) y que el equilibrio entre las dos hormonas vegetales, auxinas y citocininas, determina el grado de diferenciación del callo, se han usado ampliamente como modelo de investigación y para propagación (Skoog y Miller, 1957). Sin embargo a pesar de su amplio uso, el conocimiento sobre los mecanismos moleculares y epigenéticos que regulan la inducción de los callos en los tejidos es relativamente reciente (Ikeuchi y col., 2013).

La aplicación exógena de auxinas y citocininas inducen la formación de callo en varias especies vegetales, en términos generales una relación intermedia de auxinas y citocininas induce la formación de callo, mientras que una alta proporción de auxinas-citocininas induce la formación de raíces y una baja relación de auxinas-citocininas induce la formación de brotes (Skoog y Miller, 1957). Desde el descubrimiento de este sistema de regeneración, ha sido ampliamente utilizado, por ejemplo, en la propagación de especies vegetales económicamente importantes que han sido transformadas genéticamente. Otras hormonas tales como brasinoesteroides o ácido absícico también inducen la formación de callo y en algunas especies pueden llegar a sustituir las auxinas o citocininas en la formación de callo (Goren y col., 1979; Hu y col., 2000).

Análisis genéticos y moleculares de mutantes con afección en la formación de callos, han puesto de manifiesto que la inducción de callo se rige a través de complejos mecanismos de regulación. La progresión del ciclo celular mitótico es suprimido en células vegetales diferenciadas terminalmente, por lo que estas readquieren competencia proliferativa como característica central en la formación del callo. La activación de un solo regulador del ciclo celular, como ciclinas o quinasas dependientes de ciclinas por si solos no son suficientes para inducir la formación de callos (Dewitte y col. 2003). En consecuencia la mayoría de los procesos de inducción de callos descritos hasta la fecha emplean reguladores transcripcionales o post-transcripcionales que causan cambios globales en la expresión génica o en la traducción de proteínas.

1.5.2 Embriogénesis somática.

Se ha definido como embriones somáticos, asexuales o adventicios los iniciados a partir de células que no son el producto de fusión de gametos (Tisserat y col., 1979). Según Litz y Jarret (1991), los embriones somáticos son estructuras bipolares, que tienen un eje apical y uno radial, aislados a partir tejido epidérmico y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Los embriones somáticos morfológicamente se asemejan a los embriones cigóticos, ya que contienen los

órganos embrionarios típicos como: radícula, hipocotilo y cotiledones. Sin embargo, las vías de desarrollo son diferentes. Durante el curso de la evolución, muchas especies vegetales, han desarrollado diferentes estrategias para la embriogénesis asexual, incluyendo embriogénesis somática, para superar varios factores genéticos y ambientales que alteran la fertilización. La embriogénesis somática ocurre bajo un grado limitado de condiciones naturales, por ejemplo: al interior de los óvulos de *Peonia*. La embriogénesis somática es usada como un sistema modelo para estudios relacionados con el desarrollo embrionario (von Arnold y col., 2002).

La diferencia entre embriogénesis somática directa e indirecta no es claramente evidenciable. Debido a que la embriogénesis somática directa toma lugar a partir de células embriogénicamente predeterminadas. En contraste, la embriogénesis somática indirecta debería tomar lugar primero a partir de células no determinadas o desdiferenciadas como callos previo a la formación de masas proembriogénicas (von Arnold y col., 2002).

La regeneración vegetal vía embriogénesis somática incluye cuatro etapas:

- a. Inducción. Hay una división celular activa y un incremento en el tamaño de tejido; aunque inicialmente mantiene la forma esférica o globular; se hacen visibles los meristemos primarios (protoderma, meristemo del cambium y procambium) y se da una vacuolación extensiva.
- b. Crecimiento primario. En un estado desdiferenciado los meristemos radiculares y apicales se pueden reconocer como células meristemáticas diferenciadas. En el estado de corazón, en el extremo apical, aparece un anillo de células con división activa, es aquí donde surgen los meristemos apicales que crecerán para formar los cotiledones.
- c. Maduración de embriones. Hay una división celular activa en las células del anillo apical para formar una yema apical visible; la actividad meristemática produce un domo apical. Hay entonces un cese de la actividad mitótica que coincide con una disminución en el contenido de agua y con la aparición de

otros eventos asociados a la formación de embriones diferenciados con radículas y cotiledones. Las células del embrión maduro son más pequeñas que la de la planta a formar y no presentan características de células diferenciadas. Estas células se encuentran arregladas en líneas definidas; por ejemplo: el meristemo apical es un pequeño grupo de células, que en zanahoria, por ejemplo son solo ocho células.

- d. Germinación de embriones: La imbibición acuosa inicia el proceso de germinación que involucra la reanudación de la actividad mitótica junto con la expansión y división celular. Los cotiledones se expanden y se desarrollan primordios foliares, el hipocotilo se expande y la raíz primaria crece (Cruz, 1998).

La embriogénesis somática se deriva típicamente de una célula y pasa por los estadios: globular, corazón, torpedo y cotiledonario; de acuerdo a la etapa del cultivo (Fujimura, 2013). Los embriones somáticos maduros pueden ser encapsulados y usados como semillas sintéticas (Redenbaugh y col., 1986).

1.5.3 Organogénesis vegetal.

La organogénesis vegetal *in vitro* es un proceso durante el cual, órganos *de novo* como yemas, brotes y raíces, se producen a partir de tejidos cultivados, también referidos como explantes, bajo ciertas condiciones físicas y químicas. Esto es debido a que las células maduras de la planta tienen la capacidad de revertir su estado de diferenciación y producir nuevos órganos, en virtud de las condiciones de cultivo. La organogénesis no solo sigue siendo una herramienta en campos de aplicación tales como el mejoramiento o la modificación genética, propagación clonal o almacenamiento de germoplasma, sino que también proporciona un sistema experimental útil, para el estudio de mecanismos regulatorios del desarrollo de la planta (Zhao y col., 2008).

Dado que el principio de totipotencia celular que nos dice que “cualquier tipo de célula vegetal sin importar el grado de diferenciación que tenga, contiene la información genética necesaria para diferenciarse en una planta completa”, fue

descrito por Gottlieb Haberlandt a principios del siglo XX (Haberlandt, 1902), diversos tipos celulares y órganos, incluyendo órganos vegetativos y órganos reproductivos, de diversas especies vegetales se han regenerado exitosamente (Zhao y col., 2008).

El proceso de organogénesis inicia con la formación y desarrollo de tejido meristemático ya sea apical o radicular. En el explante se producen zonas de rápida división celular o meristemoides, y estas a su vez estimulan la división de células adyacentes, estas toman nutrientes y metabolitos de células periféricas, limitando la potencialidad divisoria de estas últimas (Litz y Jarret, 1991).

Una función primaria de la mitosis en la organogénesis consiste en la formación de un número crítico de células en división activa; las cuales son capaces de responder a las señales de desarrollo; de ahí que el proceso de organogénesis en sus estadios tempranos exhiba un crecimiento unipolar o radicular (Litz y Jarret, 1991).

Los meristemoides se componen de células pequeñas, isodiamétricas, con un citoplasma denso, vacuolas pequeñas y núcleo prominente; usualmente contienen grandes cantidades de almidón, orgánulos y presentan conexiones vasculares con el tejido circundante (Litz y Jarret, 1991).

El análisis fisiológico de organogénesis *in vitro* permitió la identificación de un papel predominante de la relación de auxinas y citocininas exógenas en el medio, el cual es un determinante químico para el desarrollo y morfogénesis en las plantas (Skoog y Miller, 1957). La organogénesis *in vitro* depende de la aplicación exógena de RCV, particularmente auxinas y citocininas, así como de la edad fisiológica de la planta de la que procede el explante, la capacidad de respuesta del tejido a los RCV y a los cambios durante el cultivo. Basado en el requisito temporal de un equilibrio específico de hormonas exógenas, se han caracterizado tres fases durante la organogénesis vegetal. En la primera fase células de los explantes adquieren “competencia” que se define como la posibilidad (no la capacidad) de responder a las señales hormonales para la inducción de órganos. El proceso de

adquisición de competencia organogénica de aquí en adelante se le conoce como “desdiferenciación”. Durante la segunda fase las células quiescentes o competentes entran de nuevo al ciclo celular y el destino de las células es determinado de acuerdo al balance hormonal para formar primordios de un órgano determinado, que es el paso clave durante la organogénesis *de novo*. Finalmente en la tercera fase, la morfogénesis procede de forma independiente de las fitohormonas suministradas exógenamente (Sugiyama, 1999).

En los cultivos organogénicos la formación de brotes y de raíces, ocurren por vías separadas y se consideran como eventos independientes y mutuamente excluyentes. Regularmente primero se induce la diferenciación hacia la formación de brotes apicales en el explante con una combinación de RCV que incluya una alta relación de citocininas/auxinas; y una vez obtenidos los brotes se induce la formación de raíces con una relación de citocininas/auxinas baja (Litz y Jarret, 1991; Sugiyama, 1999).

La formación de brotes es el proceso más estudiado en la organogénesis *de novo*. Debido a que el meristemo apical da lugar a todas las partes aéreas de la planta, la formación de brotes es utilizada en la agrobiotecnología para la propagación de especies económicamente importantes de forma masiva y bajo condiciones controladas. Además la organogénesis *de novo* es un excelente sistema biológico para estudiar procesos del desarrollo como: la iniciación de células madre, la determinación del destino celular, la diferenciación celular y la señalización hormonal (Che y col., 2006, Birnbaum y Sánchez, 2008).

La inducción del meristemo apical implica el desarrollo de un patrón de organización celular similar al existente en el meristemo apical embrionario (Mayer y col., 1998; Gordon y col., 2007). El meristemo apical se compone de tres zonas celulares distintas: central, periférica y lateral. En la parte superior de la zona central hay un centro quiescente con células madre, las cuales se renuevan para permanecer en el centro quiescente o se diferencian y son desplazadas a la zona periférica, y ya en esa zona pueden experimentar diferenciaciones subsecuentes y

pasar a la zona lateral y formar parte de los tejidos del tallo. Además de tener una organización celular similar, existe un grupo de proteínas conservado tanto en embriogénesis como en organogénesis que regula la arquitectura del meristemo durante todo el desarrollo de la planta. La expresión WUSCHEL es el primer evento que marca la iniciación de células madre y la formación de zonas meristemoides (Litz y Jarret, 1991; Gordon y col., 2007; Cheng y col., 2013).

Diferentes proporciones de auxinas y citocininas exógenas determinan el destino celular de los explantes cultivados *in vitro*, lo que indica la importancia de estas dos hormonas y el potencial de diafonía entre estas dos hormonas para inducir un patrón de formación de nuevos órganos. Experimentos previos han demostrado que la respuesta a citocininas es crítica para la iniciación de células madre *de novo* y para el establecimiento de los meristemos (Gordon y col., 2007; Su y col., 2009; Cheng y col., 2010). Las citocininas inducen la expresión de WUSCHEL, y esta es suficiente para inducir la formación meristemos apicales (Gordon y col., 2009).

En 2013 Cheng y col., demostraron que un gradiente espacio-temporal de auxinas, establecido por la biosíntesis local y el transporte polar, es regulado por la respuesta inducida por citocininas durante la formación de brotes. El patrón de auxinas y citocininas era crítico para la inducción espacial de WUSCHEL, la creación del meristemo apical y la posterior regeneración de los brotes. Los resultados revelaron un efecto cruzado de auxinas y citocininas durante la inducción de los brotes que implica nuevos componentes intermedios de señalización.

Los cambios en los tejidos, la arquitectura y el tamaño de las raíces se producen a partir de cambios en los meristemos radiculares a partir de un patrón altamente estereotípico de divisiones celulares. La iniciación de los meristemos radiculares ocurre desde los estadios más tempranos del desarrollo embrionario o en organogénesis ocurre a partir de que los brotes son transferidos a medio para enraizamiento el cual usualmente contiene una menor concentración de nutrientes

(Por ejemplo medio MS al 50%) o es suplementado con auxinas. A diferencia del meristemo apical de los brotes, el meristemo radicular está formado por una sola capa celular de aproximadamente 96 células, las cuales están cubiertas por una capa que protege al meristemo del daño mecánico o del ataque de patógenos. Dentro del meristemo radicular se encuentra un centro quiescente formado por cuatro células cuya tasa de proliferación es muy baja (Malamy y Benfey, 1997). Desde el centro quiescente hasta la zona basal la raíz se compone de cilindros concéntricos de células que se organizan en diferentes tejidos: el cilindro central, periciclo, endodermis, capa cortical y epidermis (Gutiérrez, 2012).

La función del centro quiescente consiste en mantener el estado indiferenciado de las células madre que le rodean. Las células madre que se hayan en la parte central de la cofia (columela) se dividen asimétricamente, de modo que las que están en contacto con el centro quiescente permanecen como células madre pero las subsecuentes se diferencian. Estas últimas se distinguen morfológicamente por la presencia de gránulos de almidón, y su función está relacionada con la percepción de la gravedad durante el crecimiento de la raíz (Gutiérrez, 2012).

Estudios recientes han demostrado que los genes *PLETHORA* se activan por acción de las auxinas y estos regulan la especificación del centro quiescente y de las células madre que lo rodea. Cuando estos genes se expresan ectópicamente, son capaces de inducir la formación de nichos celulares similares a centros quiescentes, lo que podría dar lugar a la formación de raíces secundarias (Malamy y Benfey, 1997; Aida y col., 2004).

Sin embargo los genes *PLETHORA* no son los únicos. Otros factores de transcripción como retinoblastoma, E2F, SHR y SCR desempeñan un papel clave en procesos como la replicación del ADN y control del ciclo celular durante la diferenciación de células madre que componen el meristemo apical de la raíz y, permitiendo el mantenimiento del centro quiescente (Nakajima y col., 2001; Sabatini y col., 2003; Cruz y col., 2012).

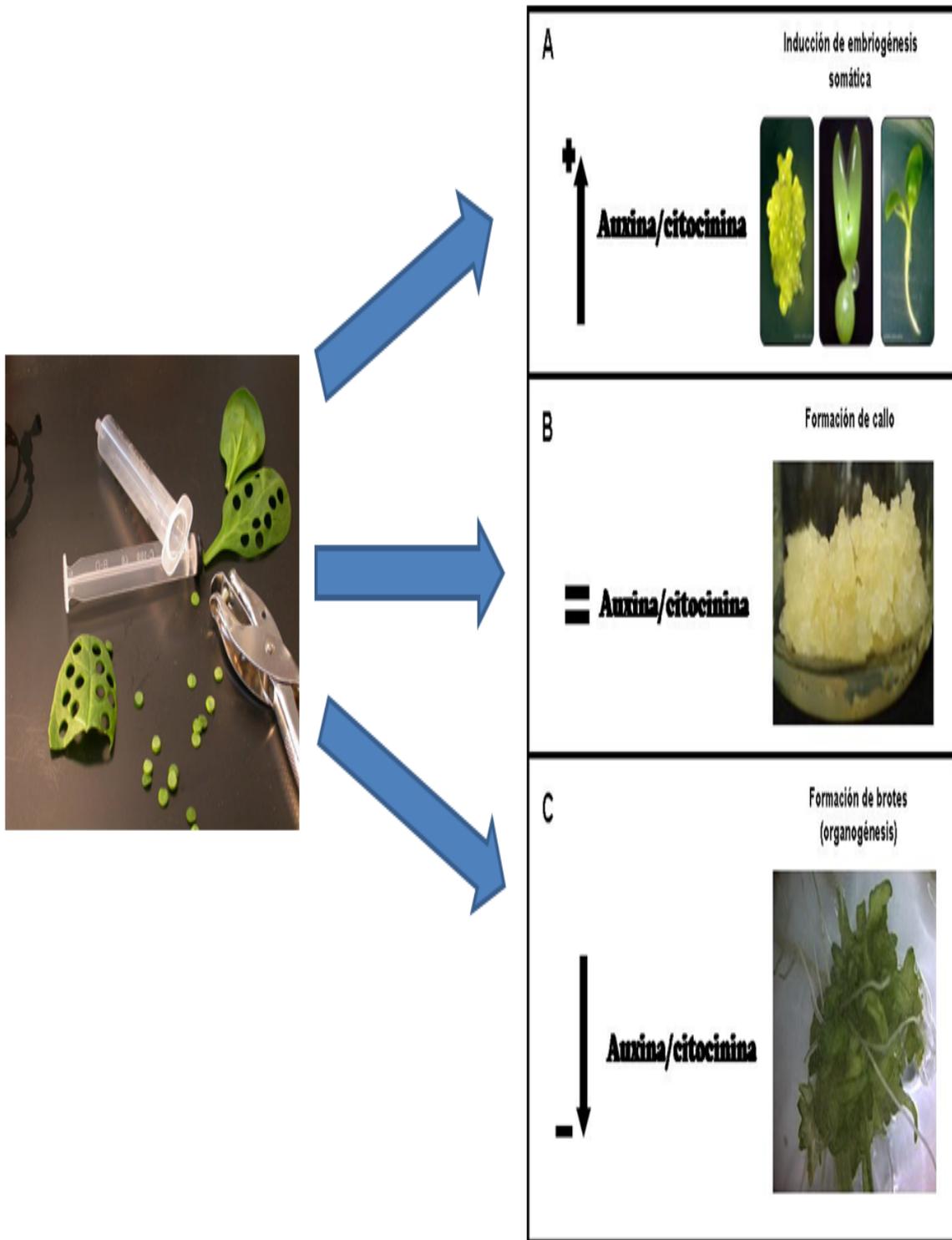


Figura 2. Efecto de auxinas y citocininas en el destino celular y morfogénesis en explantes cultivados *in vitro* (Ríos, 2009).

1.6 Pasos para establecer un sistema de regeneración vía organogénesis indirecta.

El establecimiento de un sistema de regeneración vía organogénesis indirecta como se ilustra en la figura 3 se realiza en siete etapas las cuales son:

- i. Establecer las condiciones de asepsia necesarias para evitar la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir los explantes, competir con ellos por los nutrientes presentes en el medio o modificarlo. Para establecer cultivos asépticos es conveniente:
 - a) Trabajar en ambientes adecuados.
 - b) Esterilizar los medios de cultivo, cristalería e instrumentación utilizada durante el cultivo.
 - c) Desinfectar superficialmente semillas o explantes, liberándolos de hongos o bacterias superficiales.
 - d) En casos excepcionales o en cultivos de corta duración se puede suplementar el medio con antibióticos.
- ii. Selección del explante: La elección del explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento del cultivo; en primera instancia dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. En organogénesis indirecta implica el paso intermedio de la desdiferenciación del explante en tejido calloso. La proliferación callosa puede hacerse extensiva a cultivos como células en suspensión o protoplastos, con medios de cultivo más elaborados. La selección del explante apropiado se realiza analizando el tejido que presente mayor porcentaje de inducción y a otras características como: disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad, pigmentación, consistencia y rápida respuesta *in vitro*. La elección del explante apropiado se complica si se pretende la regeneración de plantas a partir de callos ya que no todos los explantes que producen callos posibilitan la regeneración de las plantas; por lo que se deberá evaluar la capacidad de rediferenciación de los callos procedentes de los diferentes tejidos (Mroginski y Roca, 1991).

- iii. Establecimiento del cultivo *in vitro*: Una vez que se han establecido las condiciones asépticas y se ha seleccionado el explante adecuado; es importante considerar que al aislar un tejido u órgano vegetal provoca estrés en el metabolismo celular y en forma importante altera el balance hormonal. Por ello es importante dar las condiciones nutrimentales como hormonales al explante seleccionado, para que las células sobrevivan en una alta proporción y respondan eficientemente a las condiciones *in vitro*.
- iv. Crecimiento del inoculo: En estado de crecimiento, el explante se multiplica con la formación de callos. En las vías de regeneración indirectas, se tiene que producir una masa de tejido vegetal como callo suficiente para los experimentos posteriores. La fase de crecimiento puede deberse a la división de las células, al aumento en su tamaño o a ambas.
- v. Diferenciación de brotes adventicios: La diferenciación de brotes adventicios permite la formación *de novo* de estructuras unipolares. Los brotes adventicios tienen su origen en la formación de tejido meristemático y la posterior diferenciación en ápices ya sea directamente o a partir de callos originados también del explante. Para que se dé la rediferenciación hacia brotes es necesario cambiar el balance hormonal en el medio, esto es, aumentar la concentración de citocininas y disminuir la de auxinas exógenas. La rediferenciación está asociada con la producción de nuevas células cuya organización está previamente programada, pero es influida por las condiciones *in vitro* además de que hay una concomitante ganancia de peso seco.
- vi. Enraizamiento de los brotes: El proceso de enraizamiento de los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente del trasplante a un medio con menor concentración de sales. El medio MS por ejemplo, diluido al 50% ha dado resultados positivos en diferentes especies. A si mismo se requiere disminuir o eliminar las citocininas del medio e incrementar la concentración de auxinas exógenas (Thorpe, 1980). En la micropropagación a gran escala de especies ornamentales, la diferenciación del sistema radicular *in vitro*, no

es económicamente factible, por lo que este proceso se lleva a cabo en cámaras de humidificación.

- vii. **Aclimatación:** Las plántulas regeneradas *in vitro* no se pueden trasplantar directamente a condiciones *ex vitro* sin una paulatina adaptación a las condiciones ambientales. Esto es porque las plántulas regeneradas *in vitro* no están adaptadas al intercambio gaseoso puesto que tienen una cutícula muy delgada, no hay regulación del movimiento estomático, tienen una tasa fotosintética baja y si la formación del sistema radicular fue inducida *in vitro*, la plántula se tiene que habituar a las condiciones del suelo y a ambientes con una humedad relativa más baja (Pospisilová y col., 1999).

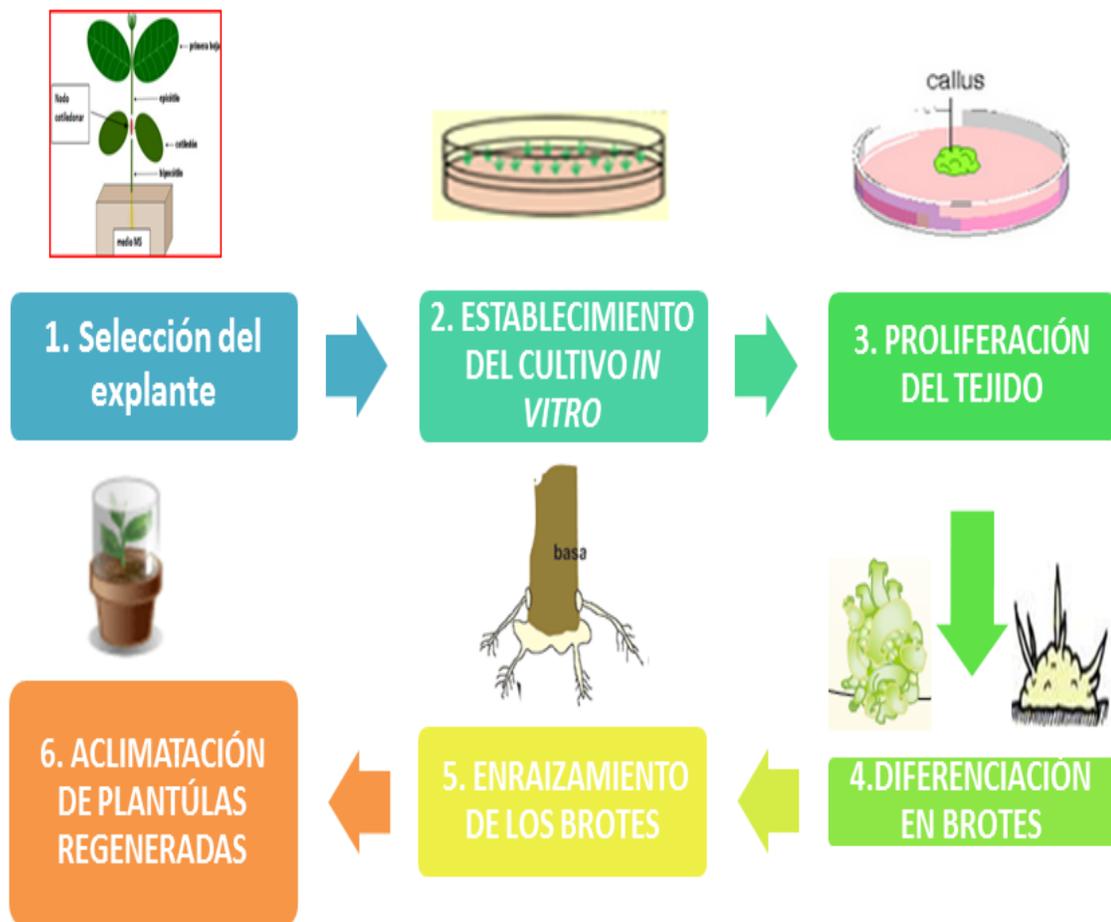


Figura 3. Etapas del establecimiento de un sistema de regeneración vía organogénesis indirecta.

1.7 Aplicaciones del CTV.

La importancia del CTV se fundamenta en el gran número de aplicaciones que genera, ya que se pueden realizar una amplia gama de estudios y análisis sin que los factores nutrimentales o ambientales interfieran con los resultados, ya que estos están controlados (Mroginski y Roca, 1991).

Uno de los factores que pone en relevancia la importancia del CTV es que posibilita la transformación genética mediante el establecimiento de sistemas de regeneración de los explantes transformados que permitan alcanzar el objetivo deseado.

El CTV es una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento genético ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, con un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. El mejoramiento genético puede conferirle resistencia a plagas y enfermedades, incrementar la tolerancia a condiciones ambientales adversas como sequía, inundaciones, calor, frío y heladas (disminuir el estrés abiótico) o puede potenciar alguna característica importante que pueda hacer más productiva a la planta, todo esto se puede realizar con las diferentes técnicas que se derivan del CTV (George y col., 2008).

Otras de las aplicaciones del CTV son: la obtención y propagación de especies libres de fitopatógenos, la micropropagación y conservación del germoplasma de especies raras, amenazadas o en peligro de extinción; propagación masiva de especies vegetales que describen un crecimiento lento, baja eficiencia de reproducción o no producen semilla viable; obtener líneas haploides, asexuales o androestériles; bioconversión y producción de diversos metabolitos de interés comercial; estudios básicos de bioquímica, fisiología y genética; aplicación de técnicas de biología molecular e ingeniería genética para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal, modificar rutas metabólicas, generar variabilidad genética, diseñar marcadores moleculares para detectar híbridos o nuevas variedades, manipulación genética de protoplastos; y detección de virus,

viroides y otros organismos fitopatógenos(Karuppusami y col., 2009; Doran, 2009; Ferrie y col., 2011).

1.8 Modelo de estudio: Cempaxúchitl.

1.8.1 Descripción botánica.

El cempaxúchitl (*Tagetes erecta L.*) es una planta perteneciente a la clase Magnoliopsidae (*Angiospermae*), la subclase *Dicotyledoneae*, al orden de los Asterales y a la familia *Asteraceae* (Compositae). Es una planta anual, erecta, de hasta 1.8m de altura, muy aromática al estrujarse. Tallos estriados, que pueden ser glabros o pubescentes; sus hojas llegan a medir de 4 a 12 cm de longitud, son pinnadas y de 11 a 17 foliolos, lanceolados o linear-lanceolados, alcanzando hasta 5 cm de largo por 1.5 ancho. Las inflorescencias son cabezuelas que se pueden presentar brácteas, el involucreo es campanulado, de 13 a 20 mm de alto por 9 a 25 mm de ancho. Las flores liguladas son numerosas, con coloraciones que van del amarillo al rojo en diferentes tonalidades, las láminas son oblanceoladas de 1 a 2 cm de largo, las flores de disco son de 150 a 250 en total en las cabezuelas sencillas; sin embargo, en las cabezuelas dobles estas flores muestran diferente grado de transformación en las lígulas (Rzedowski y de Rzedowski, 2005). Las inflorescencias por lo general son numerosas y la coloración se debe a la presencia de carotenoides, de los cuales el principal es la luteína (Delgado y Paredes, 1996).

1.8.2 Distribución e importancia económica.

1.8.2.1 Distribución.

El género *Tagetes* incluye alrededor de 56 especies que crecen a lo largo de todo el continente americano, desde el suroeste de los Estados Unidos de Norteamérica hasta regiones de Argentina. Entre las especies más comunes se

encuentran: *T. patula*, *mendocina*, *erecta*, *lemoni*, *filifolia*, *lucida*, *terniflora*, *minuta*, *campanatula*, *laxa*, *lunulata*, *micrantha*, (Vasudevan y col., 1997; Rzedowski y de Rzedowski, 2005). La especie *Tagetes erecta* es originaria de México y se cultiva principalmente en los estados de Puebla, Estado de México, Michoacán y Distrito Federal (SAGARPA, 2012).

1.8.2.2 Importancia económica.

T. erecta, *T. mendocina*, *T. minuta*, *T. patula* y *T. argentina* son especies resistentes al ataque de nematodos debido a la producción de tiofenos. Esta resistencia ha llamado mucho la atención y es por eso que muchos trabajos de investigación se han realizado para analizar y mejorar la producción de tiofenos en las raíces de estas especies; los agricultores incluyen el cultivo de alguna de estas especies en la rotación de cultivos para controlar estos patógenos (Croes y col., 1994; Rodríguez y col., 1994; Arroo y col., 1994, Jacobs y col., 1995; Arroo y col., 1997; Vasudevan y col., 1997; Massera y col., 1998).

El cempaxúchitl ha sido cultivado desde tiempos ancestrales, principalmente con fines ornamentales, ya que se ha utilizado tradicionalmente en ceremonias religiosas relacionadas con los muertos, por lo que se le conoce también con el nombre de “flor de muerto”. También es conocida por su uso en la medicina tradicional como desparasitante, antiespasmódico y en el tratamiento de enfermedades del estómago, bazo e hígado (Delgado, 1997; Guzmán y Paredes, 1998).

Actualmente el cempaxúchitl es un recurso que tiene una creciente demanda industrial, ya que los carotenoides acumulados en sus inflorescencias, de los cuales la luteína es el principal y comprende del 70 al 95% del contenido de pigmentos en la flor, y estos son utilizados en la elaboración de alimento para aves de corral, con el fin de pigmentar la piel de los pollos y la yema de sus huevos; peces y crustáceos, mejorando la calidad y aceptación de estos productos por el

consumidor (Delgado y Paredes, 1997; Delgado y col., 2000; Sowbhagya y col., 2013).

El mercado actual a nivel mundial no solo demanda productos que además de tener una capacidad nutricional, provoquen algún efecto benéfico en la salud humana (anticancerígeno o antioxidante), lo cual asegura la permanencia del cempaxúchitl a nivel mundial por mucho tiempo debido al tipo de pigmento que sintetiza (Sowbhagya y col., 2013). Además de la función de los carotenoides como colorantes, destacan por su importancia a nivel fisiológico la propiedad de algunos de ellos es ser precursores de vitamina A y otros antioxidantes (Van den Berg y col., 2000; Ye y col., 2000; Toledo de Oliveira y col., 2004); como el β -caroteno que protege del daño por radicales libres que son los responsables de varias enfermedades degenerativas como arteriosclerosis, artritis y carcinogénesis (Hof y col., 2000; Roodembury y col., 2000; West, 2000).

1.8.3 Producción.

El sistema de producción de flor de cempaxúchitl es mediante trasplante. Las plántulas se desarrollan en almácigos y se trasplantan al campo cuando alcanzan alrededor de 10 cm de altura (20 a 45 días). Una vez en el campo, las plantas continúan su desarrollo hasta alcanzar la floración y cumplir con el ciclo de vida de alrededor de 110 días. Los rendimientos son muy variables dependiendo del manejo de cultivo, obteniéndose desde 12 hasta 30 ton de flor/Ha en un máximo de 7 cortes (Delgado, 1997).



Figura 4. Variedades de cempaxúchitl.

1.9 Antecedentes del CTV en cempaxúchitl.

Existen diversos reportes sobre la regeneración de cempaxúchitl vía organogénesis y embriogénesis somática, tanto de forma directa como indirecta a partir de la rediferenciación de los callos, para ello se han utilizado explantes como hojas cotiledonares, hojas maduras e hipocotilo (Kothari y Chandra, 1984; Belarmino y col., 1992; Besspalhok y Hattori, 1998; Mohamed y col., 1999; Misra y Datta, 2001; Vanegas y col., 2002 y García, 2007).

Según la respuesta que se desea obtener se han empleado diferentes que sea desea obtener; se ha reportado la formación del callo bajo la combinación de inductores 2,4-D con BAP o KIN y 2,4-D con ANA. En estos trabajos se ha reportado la formación de callo friable con coloraciones que varían entre el amarillo, verde y café (Belarmino y col., 1992; Besspalhok y Hattori, 1998; Mohamed y col., 1999; Misra y Datta, 2001; Vanegas y col., 2002, García, 2007; Osman y col., 2012).

Entre los trabajos de regeneración de cempaxúchitl vía organogénesis indirecta se encuentra el de Belarmino y col. (1992) probaron dos tipos de explante de *Tagetes erecta*: porciones de hipocotilo y segmentos de hoja. Expusieron estos explantes a distintas combinaciones de ANA 0.2 a 1 mg/L y BAP 0.5 a 5.0 mg/L en medio MS obteniendo formación de órganos adventicios en la mayor parte de los tratamientos utilizados; sin embargo, en la mayoría de tratamientos la producción fue de raíces; la producción de brotes estuvo delimitada a pocos tratamientos y en su caso, el tejido que mejor respuesta produjo fue el de hipocotilo, los explantes de hoja produjeron únicamente raíces.

Misra y Datta (2001) reportaron la organogénesis directa a partir del cultivo de segmentos foliares en medio MS adicionado con BAP 4.44 μM y AG₃ 14.43 μM ; una vez inducidos los brotes estos se cultivaron en ANA 0.27 μM para su enraizamiento y los resultados obtenidos se compararon con plantas germinadas a partir de semillas, encontrando que las plántulas obtenidas *in vitro* presentaban características más homogéneas.

En 2002 Vanegas y col., establecieron un protocolo efectivo para la regeneración de plántulas de cempaxúchitl que comenzó con la selección del explante entre hojas, tallos y cotiledones con BAP 4.44 μM y ANA 2.7 μM , encontrando que la hoja era el tejido que tenía una mayor respuesta para la inducción de callos, brotes y raíces, posteriormente se probaron diferentes combinaciones de BAP con ANA y AIA, encontrando que la combinación BAP 13.3 μM y AIA 17.1 μM producía una mayor Capacidad Formadora de Brotes (CFB), de igual manera reportaron la aclimatación exitosa y el desarrollo de manera normal de las plantas regeneradas.

En 2006 Miranda y col., reportaron la regeneración exitosa de cempaxúchitl a partir de ápices cultivados en medio MS modificado de acuerdo a lo reportado por Robert y col. (1987), y suplementado con BAP 70 μM y AIA 10 μM , después de 10 semanas de cultivo encontraron una respuesta del 70% de los explantes hacia la formación de brotes, sin embargo las plántulas regeneradas bajo estas condiciones de cultivo presentaron una alta tasa de vitrificación la cual fue asociada por los mismos autores al elevado contenido de BAP en el medio.

Existe un solo reporte de la regeneración de *Tagetes erecta* vía embriogénesis somática por Bespalhok y Hattori (1998) trabajando con explantes cotiledonarios obtuvieron callo embriogénico y embriones somáticos. Los tratamientos fueron básicamente las combinaciones de 2,4-D 2 mg/L y CIN 0.2 mg/L, algunos incluyeron tidiazurón (TDZ) 0.02 mg/L y AAB 3 mg/L, además probaron modificando la concentración de sacarosa del medio MS utilizando 60 g/L; a pesar de obtener embriones somáticos reportaron problemas en la germinación por lo que no lograron regenerar plantas completas a partir del material utilizado.

2. HIPÓTESIS

El explante seleccionado en su estado desdiferenciado sometido a diversas combinaciones de RCV en el medio de cultivo *in vitro*, permite la formación de meristemas apicales o radiculares, los cuales bajo el sistema de aclimatación propuesto serán capaces de regenerar plantas completas de cempaxúchitl (*Tagetes erecta*) con características idénticas a las del parental.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Establecer un sistema de cultivo de tejidos *in vitro* para la regeneración de *Tagetes erecta* vía organogénesis indirecta.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar un método de desinfección para las semillas de *Tagetes erecta* (cempaxúchitl).
- Establecer el sistema de CTV de *Tagetes erecta* basado en organogénesis.
- Regenerar y aclimatar plántulas de *Tagetes erecta*.

4. METODOLOGÍA

4.1 Material vegetal.

Se utilizó semilla de cempaxúchitl (*Tagetes erecta*) de la variedad “Grande Doble”, distribuida por la empresa Rancho los molinos, S. A. de C.V. Tepoztlán, Mor., México. Este material es vendido por dicha empresa para la utilización de la flor como material de ornato.

4.2 Métodos

4.2.1 Desinfección de las semillas.

La desinfección de la semilla se realizó mediante dos tratamientos: el primero comprende lavados consecutivos, primero con etanol absoluto durante 1 minuto; un segundo lavado con etanol al 70% (v/v) por 5 minutos; posteriormente el tercer y cuarto lavado se realizó con soluciones de hipoclorito de sodio al 2%(v/v) y 1%(v/v) adicionándole 0.2%(v/v) de Tween 20 como surfactante, durante 15 minutos. El segundo tratamiento solo difiere del primero en las concentraciones de hipoclorito de sodio en el tercer y cuarto lavado las cuales fueron al 5%(v/v) y al 3% (v/v) respectivamente. Entre cada uno de los lavados se enjuagaron las semillas con agua destilada estéril, después fueron enjuagadas por lo menos tres veces más con agua destilada estéril, para eliminar el remanente de hipoclorito de sodio en la testa de la semilla y finalmente se dejaron secar sobre papel Millipore® estéril en un caja Petri sellada con Parafilm®. Todo este proceso se llevó a cabo bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar.

4.2.2 Germinación *in vitro* de semillas.

Una vez que fueron desinfectadas las semillas, se germinaron *in vitro* en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 30 g/L de sacarosa y gelificado con 8 g/L de agar, libre de fitohormonas. Se ajustó el pH del medio a 5.8 previo a la

esterilización en autoclave a 15 psi por 15 min para todos los medios de cultivo. Se sembraron 4 semillas por frasco y 25 frascos para cada tratamiento; los frascos contenían 25 mL del medio MS previamente preparado. Los frascos se sellaron con Parafilm®. Todo el proceso de manipulación de las semillas se realizó con pinzas y cristalería previamente esterilizada. Se evaluó el índice de germinación de la semilla con respecto al tiempo y el porcentaje de contaminación en el medio de cada tratamiento de desinfección. Todos los cultivos se mantuvieron bajo condiciones ambientales.

4.2.3 Selección del explante

Una vez que se obtuvieron los cultivos libres de toda contaminación, se procedió con los experimentos de inducción de callo a partir de cinco tipos de explantes: hipocotilos y epicotilos de una longitud aproximada de 3 a 5 mm; y porciones de hoja, nodo y cotiledón de 0.25 cm² de área. Los explantes fueron obtenidos de plántulas de aproximadamente 7cm de altura y 3 semanas de edad fisiológica.

Los explantes fueron sembrados en medio MS suplementado con 2,4-D (6.74 µM) y BAP (2.2 µM) 30 g/L de sacarosa. Los medios fueron solidificados con 3 g/L de fitagel y se ajustó el pH a 5.8, previo a la esterilización en autoclave a 15 psi por 15 min, posterior a la esterilización se le adicionaron al medio 35 mg/L de ácido ascórbico esterilizado por filtración. En este experimento se evaluó el porcentaje de inducción de los explantes, el grado de dediferenciación, la consistencia y la pigmentación de los callos producidos. Los explantes fueron colocados en cajas Petri que contenían 20 ml del medio de cultivo, en cada caja se colocaron 10 explantes (unidad experimental) y 5 repeticiones por tejido. Las cajas Petri fueron almacenadas en oscuridad bajo condiciones ambientales.

Los callos procedentes de cada tipo de explante después de 15 días de cultivo fueron resembrados en medio MS adicionado con BAP (4.4 µM) y ANA (2.7

μM), y se evaluó el número de brotes por explante, el porcentaje de explantes con brotes y la Capacidad de Formación de Brotes (CFB). Se sembraron 10 callos procedentes de cada tipo de tejido por caja Petri con 5 repeticiones por explante.

4.2.4 Inducción del proceso de dediferenciación *in vitro*.

El explante que presentó un mayor porcentaje de inducción, grado de inducción en el tejido y una mayor CFB fue cultivado en medio MS adicionado con diferentes combinaciones de 2,4-D y BAP como se muestra en el cuadro 2; para seleccionar la combinación de RCV que indujo un mayor porcentaje de callos en menor tiempo. Se sembrarán 10 explantes por caja Petri con 5 repeticiones por cada tratamiento que se muestra en el cuadro 2, bajo las condiciones que se mencionan en el apartado anterior.

Cuadro 2. Combinación de tratamientos de 2,4-D y BAP para la inducción de callos.

Regulador de crecimiento (μM)	
2,4-D	BAP
2.26	2.2
4.52	
6.78	
9.04	
2.26	4.44
4.52	
6.78	
9.04	

4.2.5 Producción de brotes

Una vez que se seleccionó el explante y la combinación adecuada para la producción de callo, se procedió a evaluar combinaciones de BAP y AIA para la rediferenciación del callo a brotes. También se evaluó la producción directa de brotes a partir del explante seleccionado. Se sembraron los explantes en medio MS adicionado con diferentes concentraciones de BAP y AIA como se muestra en el cuadro 3. Las condiciones de cultivo fueron las mencionadas anteriormente y se evaluó la diferenciación del tejido hacia la formación de brotes después de 13 días de contacto con el medio de inducción de acuerdo a lo descrito por Vanegas y col. (2002) como el tiempo óptimo para el desarrollo de los brotes sin que estos pierdan su capacidad de regeneración.

Cuadro 3. Combinaciones de AIA y BAP para la producción de brotes.

Regulador de crecimiento (μM)	
AIA	BAP
8.5	6.6
	13.3
	19.9
17.1	6.6
	13.3
	19.9
25.6	6.6
	13.3
	19.9

4.2.6 Elongación y enraizamiento.

Una vez producidos, los brotes fueron transferidos a medio MS sin RCV para su elongación y desarrollo de las plántulas, para que las plántulas regeneradas formen raíces suficientes para ser trasplantadas a suelo.

4.2.7 Ensayo de enraizamiento directo *in vitro*.

Para determinar las condiciones del medio de cultivo para inducción de raíz se tomaron 30 plántulas para cada tratamiento de tres semanas de edad fisiológica a las cuales se les escindió la raíz , estas fueron trasplantadas en frascos con medio MS libre de RCV y suplementado con diferentes concentraciones de AIB (0.25, 0.5 y 1 mg/L). Los frascos fueron almacenados bajo condiciones ambientales. A los 15 días después del trasplante se evaluó el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia en las plántulas, el número y longitud de raíces, el número de hojas y la altura de las plántulas.

4.2.8 Aclimatación.

Las plántulas regeneradas de una altura de aproximada de 7 cm y con un sistema radicular bien desarrollado, fueron transferidas a macetas con suelo estéril. Primero se lavaron las raíces con agua para eliminar el remanente del medio de cultivo en el que se desarrollaron, posteriormente se trasplantaron en macetas las cuales se cubrieron con una bolsa para mantener la humedad ambiental necesaria para su adaptación. Estas coberturas fueron modificadas perforándolas al segundo y sexto día para disminuir la humedad interna. Las macetas se mantuvieron bajo condiciones ambientales, donde les fueron suministrados los nutrientes como se muestra en el cuadro 4, para que pudieran continuar con su desarrollo bajo condiciones totalmente *ex vitro*.

Cuadro 4. Calendario de fertilización de plántulas regeneradas.

Días	Fertilización
2	medio MS 50%
4	medio MS 50%
6	medio MS 25%
8	medio MS 25%
10 en adelante	solución de Steiner

Los porcentajes indican el 50 y 25% tanto de medio MS como de sacarosa.

4.3 Diseño experimental.

Un experimento factorial 4 x 2 (8 tratamientos totales) se diseñó para evaluar el efecto de 2,4-D y BAP a diferentes concentraciones en la inducción de callos en explantes foliares de cempaxúchitl. Cada tratamiento tiene una unidad experimental de 10 explantes por caja utilizando cinco replicas por tratamiento. Los datos obtenidos fueron analizados mediante una prueba de Tukey-Kramer HSD para determinar diferencias significativas entre tratamientos a un valor de $\alpha=0.05$.

Los experimentos de regeneración se realizaron en un diseño de bloques completamente al azar con cinco repeticiones. Cada repetición consistió en una caja Petri con 10 explantes por caja. La frecuencia de formación de brotes será evaluó cada tres días después de iniciado el experimento con microscopio estereoscópico. El número de brotes adventicios por explante se cuantificó y se analizó mediante un análisis de varianza. Las medias de los tratamientos se analizaron usando la prueba de Fisher de diferencias mínimas significativas (dms) ($\alpha=0.05$).

Para la obtención de un dato más real de la eficiencia de los tratamientos para la formación de brotes, se calculó el índice llamado Capacidad de Formación de Brotes (CFB) de acuerdo a lo reportado por Martínez y col. (1992).

$$CFB = \frac{(\text{Numero promedio de brotes por explante}) * (\% \text{ de explantes con brotes})}{100}$$

5. RESULTADOS.

5.1 Establecimiento del cultivo *in vitro*.

Se inició la asepsia de la semilla por el método reportado por Vanegas y col. (2002), pero debido a que se observó un porcentaje de contaminación superior al 10%, se procedió a modificar lo reportado, incrementando las concentraciones de hipoclorito de sodio al 3 y al 5% como se muestra en el cuadro 5. Con las modificaciones realizadas se logró eliminar totalmente la contaminación. Las plántulas desarrolladas *in vitro* de tres semanas de edad fisiológica en medio MS libre de RCV fueron utilizadas como fuente de explante para los experimentos de inducción subsecuentes.

Cuadro 5. Efecto de los tratamientos de desinfección sobre la germinación de semillas de cempaxúchitl.

Tratamiento	Desinfectante	Concentración v/v	Duración (min)	% de contaminación	% de germinación
1	Etanol	100%	1	>10	75
	Etanol	70%	5		
	NaOCl + Tween 20	2% + 0.1%	15		
	NaOCl + Tween 20	1% + 0.1%	15		
2	Etanol	100%	1	0	89
	Etanol	70%	5		
	NaOCl + Tween 20	5% + 0.2%	15		
	NaOCl + Tween 20	3% + 0.2%	15		

5.2 Selección del explante.

En la evaluación de los diferentes fuentes de explante se probaron porciones de hipocotilo y epicotilo de 3 a 5 mm de longitud y segmentos de hoja, cotiledón y nodo cotiledonar de 0.25 cm². Estos explantes fueron sembrados en medio MS suplementado con 6.74 µM de 2,4-D y 2.2 µM de BAP para la desdiferenciación de los explantes a callos y se evaluó el porcentaje de inducción, el grado de inducción del tejido, la pigmentación y la consistencia. Los resultados de este experimento se muestran en el Cuadro 6. Se observa que a los 13 días de contacto en el medio los explantes foliares tienen un porcentaje de inducción del 100% y están totalmente inducidos mientras que las porciones de hipocotilo y epicotilo solo presentan una ligera inducción en los extremos que están en contacto con el medio. En cuanto a la pigmentación y la consistencia, los explantes foliares presentan una pigmentación blanca y son friables, mientras que los cotiledones y el nodo cotiledonar producen callos compactos y de una coloración que va del amarillo claro a café, lo cual indica signos de oxidación. Los callos procedentes de cada tipo de tejido, fueron sub-cultivados en medio MS suplementado con BAP (4.4 µM) y ANA (2.7 µM) reportada por Belarmino y col. (1992), como la mejor para producir brotes; en este experimento evaluamos el número de brotes por explante, el número de explantes con brotes y la CFB para determinar que explante producía callos con características adecuadas para la regeneración. Las porciones de hoja evaluadas presentan una mejor respuesta para la formación de callos, brotes y raíz (Figura 5) consistente con lo reportado con Vanegas y col., (2002). Esto contrasta con lo reportado por Belarmino y col. (1992), quienes concluyeron que los segmentos de hipocotilo fueron una buena fuente de explante para la producción de plántulas usando 4.4 µM y ANA 2.2 µM como RCV; además reportaron que el 50% de los explantes produjeron plántulas vía organogénesis. Siempre es importante analizar el tipo de explante, ya que cada tejido de una misma planta responde diferente al efecto de los RCV en un medio de regeneración (Kulkarni y col., 2000). De este experimento como se muestra en el Cuadro 7 se determinó que

la mejor respuesta se logra con explantes de hoja y fue el explante utilizado en los experimentos posteriores.

Cuadro 6. Efecto de BAP y 2,4-D en la inducción y naturaleza del callo en diferentes explantes de cempaxúchitl.

Combinación de RCV		Tejido	% de inducción	grado de inducción	naturaleza del callo
2,4-D	BAP				
6.74 μ M	2.2 μ M	Hoja	100	+++++	Friable-Blanco
		Nodo	90	+++++	Friable-Amarillo
		Cotiledón	84	++++	Compacto-Café
		Hipocotilo	82	++	Friable-Amarillo
		Epicotilo	70	+	Compacto-Café

El grado de inducción representa la porción de tejido que está desdiferenciada o inducida como callo. Se tomó una escala donde + es ligeramente inducido y +++++ es totalmente inducido. Los resultados fueron tomados al día 15 posterior a la inducción.

Cuadro 7. Selección de explante en base a la CFB bajo una combinación de BAP y ANA

RCV		Tejido	Explantes con Brotes (%)	Numero de Brotes por Explante	CFB
BAP	ANA				
4.4 μ M	2.7 μ M	Hoja	44	1.2	0.552
		Nodo	32	1.1	0.352
		Cotiledón	28	1.1	0.282
		Hipocotilo	40	1.2	0.48
		Epicotilo	42	1.2	0.504

Los datos tomados de este experimento son a partir de callos procedentes de los diferentes tejidos, después de tres semanas de contacto con el medio de acuerdo a lo descrito por Belarmino y col. (1992).

5.3 Producción de callos.

Con explantes foliares se evaluaron distintas concentraciones de BAP y 2,4-D como se muestra en el Cuadro 8 para determinar la combinación óptima de estos reguladores para producir callos. De estos experimentos se observó que los explantes en medio MS suplementado con BAP (2.2 μM) y 2,4-D (6.74 μM) a los 13 días de contacto con el medio presentaban el 100% de inducción y tejidos totalmente desdiferenciados (Figura 6). Además se observó que al incrementar la concentración de citocininas como BAP de (2.2 μM) a (4.4 μM) hay porcentajes más bajos de inducción, por lo que podemos establecer que la inducción de callos es dependiente de la concentración de BAP de acuerdo al análisis estadístico Tukey-Kramer HSD.



Figura 5. Aspecto de brotes inducidos con BAP 4.4 μM y ANA 2.7 μM a partir de callos procedentes de explantes foliares.

Cuadro 8. Efecto de diferentes combinaciones de BAP y 2,4-D sobre la formación de callos, en explantes foliares de cempaxúchitl.

Reguladores de Crecimiento Vegetal (μM)		Frecuencia de formación de callos (%)	Tipo de callos
2,4-D	BAP		
2.26	2.2	92b	Friable-Amarillo
4.52		90b	Friable-Amarillo
6.74		100a	Friable-Blanco
9.02		86c	Compacto-Café
2.26	4.4	80d	Friable-Café
4.52		64f	Compacto-Café
6.76		66f	Compacto-Café
9.02		64f	Friable-Verde

Las letras indican diferentes grupos estadísticos a un valor de $\alpha=0.05$ realizando la prueba Tukey-Kramer HSD. Los datos de este experimento fueron tomados al día 12 después de la inducción.

Las mediciones se realizaron cada tercer día y se tomó el día 12, por que los explantes inducidos con el tratamiento de BAP 2.2 μM y 2,4-D 6.74 μM presentaba el 100% de inducción y tejidos completamente desdiferenciados.

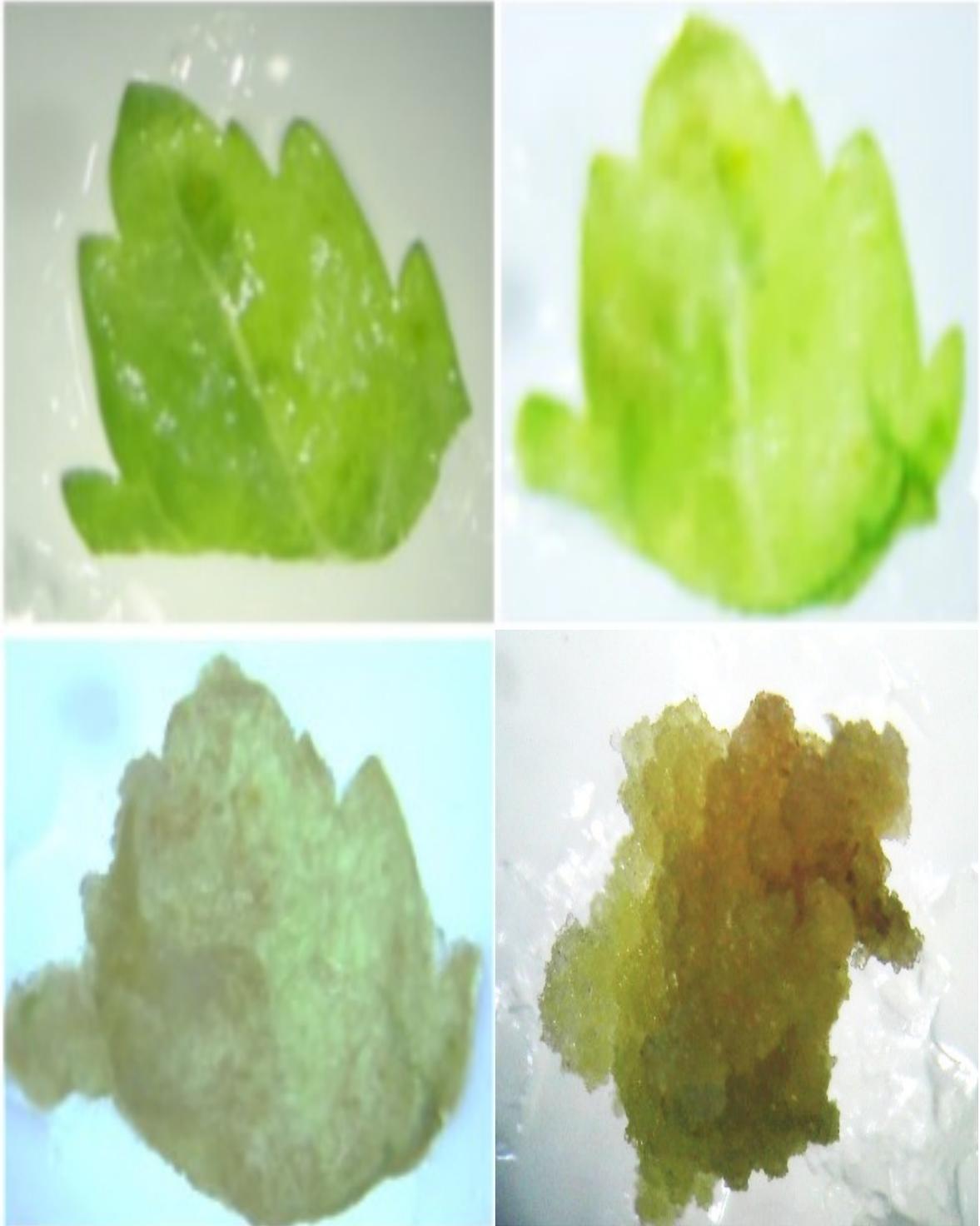


Figura 6. Inducción de callo en explantes foliares cultivados con 2,4-D $6.74 \mu\text{M}$ y BAP $2.2 \mu\text{M}$ en los días 1, 5, 7 y 13 respectivamente.

5.4 Producción de brotes.

Ya que combinaciones de BAP y AIA fueron reportadas por Vanegas y col. (2002) y Miranda y col. (2006) como las mejores para la formación de brotes a partir de hojas y ápices respectivamente, se evaluaron distintas concentraciones de estos RCV como se muestra en el Cuadro 9 utilizando explantes foliares. De estos experimentos se observó que la combinación de BAP (6.6 μM) y AIA (8.5 μM) obtuvo el mayor porcentaje de explantes por brote y el número más alto de brotes por explante siendo del 90% y 3.59 respectivamente. La eficiencia de los tratamientos se pudo evaluar más claramente al calcular el índice llamado Capacidad de Formación de Brotes (CFB) (Martínez y col., 1992). La combinación de estos dos valores da una idea de las condiciones óptimas de regeneración de plantas. El porcentaje de explantes con brotes representa la capacidad de respuesta de tejido al medio, mientras que el número de brotes por explante representa la capacidad de explante para producir brotes (Martínez y col., 1992). El tratamiento que mostró una mayor CFB de 3.23 fue también el de BAP (6.6 μM) y AIA (8.5 μM). Cabe resaltar que este resultado es superior a lo previamente reportado por Vanegas y col. (2002) con la combinación BAP (13.3 μM) y AIA (17.1) μM la cual obtuvo una CFB de 2.35 al día 13. Esta combinación también fue analizada y se obtuvo una CFB de 0.57 al día 13, por lo que es inferior a lo reportado por Vanegas y col. (2002).

Cuadro 9. Efecto de las combinaciones de BAP y AIA sobre la formación de brotes en explantes foliares de cempaxúchitl.

Regulador de Crecimiento (μM)		Explantes con brotes (%)	Numero de brotes por explante	Capacidad de Formación de Brotes (CFB)
AIA	BAP			
0	0	0f	0g	0
8.5	6.6	90a	3.59a	3.23
	13.3	42c	3.42ab	1.44
	19.9	50bc	2.25bc	1.12
17.1	6.6	38cd	3.41ab	1.29
	13.3	36cd	1.59c	0.57
	19.9	52b	2.99b	1.55
25.6	6.6	28d	1.27f	0.36
	13.3	48bc	2.43bc	1.17
	19.9	54b	1.66c	0.9

Las letras indican diferentes grupos estadísticos a un valor de $\alpha=0.05$ utilizando la prueba de Fisher de diferencias mínimas significativas.

Los resultados de este experimento se obtuvieron al día 13 posterior a la inducción ya que de acuerdo con Vanegas y col. (2002) es el tiempo adecuado de permanencia de los explantes en el medio de regeneración. Posterior a este tiempo los brotes inducidos pierden la capacidad de regenerarse.

5.5 Ensayo de enraizamiento directo *in vitro*.

Para este ensayo empleamos 30 plántulas de tres semanas de edad fisiológica por tratamiento a las cuales se les escindió el sistema radicular y fueron trasplantadas a medio MS libre de hormonas y suplementado con AIB (0.25, 0.5 y 1 mg/L) como se muestra en el Cuadro 10. Las plántulas que fueron trasplantadas en medio MS libre de hormonas, presentaban un menor número de raíces, pero eran raíces largas, vigorosas y con gravitropismo como se muestra en la Figura 7, efecto relacionado con un mayor porcentaje de aclimatación. A sí mismo en este tratamiento se observó un mayor porcentaje de sobrevivencia, plántulas mas altas y con mayor numero de hojas como se muestra en la Figura 7. En contraste con esto las plántulas sembradas en medio MS suplementado con AIB como se muestra en la Figura 8 presentaban un mayor número de raíces, pero eran raíces adventicias, cortas, pilosas y sin gravitropismo, efecto relacionado con un bajo porcentaje de aclimatación.

Cuadro 10. Efecto de concentraciones de AIB sobre la formación de raíces *de novo* en plántulas de cempaxúchitl.

RCV	Porcentaje de enraizamiento	Porcentaje de sobrevivencia	Numero de raíces	Longitud de raíces (cm)	Altura de la planta (cm)	Numero de hojas
AIB (mg/L)						
0	93.33	93.33	12.6	11.6	13.6	13.6
0.25	100	66.6	33.4	5.3	7.8	7.8
0.5	100	100	29.7	6.6	12.3	12.3
1	60	66.6	48.2	3.1	7.5	7.5



Figura 7. Formación de raíces *de novo* en plántulas de cempaxúchitl en medio MS libre de hormonas.



Figura 8. Formación de raíces *de novo* en plántulas de cempaxúchitl en medio suplementado con AIB.

5.6 Elongación y enraizamiento.

Los explantes que presentaron brotación fueron transferidos a medio sin reguladores de crecimiento donde los brotes se elongaron y desarrollaron un sistema radicular normal, como se muestra en la Figura 9. Dentro del cultivo de tejidos vegetales en ocasiones es necesario transferir los brotes a medios suplementados con auxinas principalmente con la finalidad de producir raíces (Pérez y col., 1999). En este caso, los datos que nos arrojó el ensayo de enraizamiento directo, nos indican que al suplementar el medio MS con auxinas como AIB se altera el patrón de desarrollo del sistema radicular, induciéndose raíces adventicias poco aptas para la aclimatación. No fue necesaria la adición de ningún regulador, ya que al ser transferidas a medio MS libre de hormonas las plántulas se desarrollan y producen raíces de forma normal. Tres semanas después las plántulas alcanzan una altura aproximada de siete centímetros, así como un sistema radicular suficiente para ser trasplantadas a suelo y posteriormente aclimatadas.



Figura 9. Aspecto de una plántula regenerada a partir de brotes inducidos bajo la combinación de BAP 6.6 μM y AIA 8.5 μM en explantes foliares de cempaxúchitl.

5.7 Ensayo de aclimatación *ex vitro*.

Para este experimento empleamos 20 plántulas de tres semanas de edad fisiológica. Las plántulas desarrolladas *in vitro* fueron transferidas a macetas con suelo estéril y una cubierta plástica, como se muestra en la Figura 10, y se incubaron bajo condiciones ambientales por dos semanas. Durante este periodo las macetas fueron regadas cuatro veces, con medio MS al 50% de la concentración de sales y sacarosa los días 2 y 4, los días 6 y 8 con medio MS al 25%, a partir del día 10 fueron regadas con solución de Steiner periódicamente como se muestra en el Cuadro 11. A los días 2 y 6 la cubierta plástica, se modificó para disminuir la humedad interna, lo que permitió que las plantas se adaptaran a condiciones de menor humedad, para que finalmente puedan completar su ciclo hasta floración bajo condiciones totalmente *ex vitro*. En este trabajo, la frecuencia de supervivencia fue del 80% y no se encontró problema alguno en la adaptación de las plantas, demostrando que el sistema fue eficiente para la aclimatación de plantas. En otros trabajos como el de Kothari y Chandra (1984) reportaron aclimatación de plantas; sin embargo, en su caso, las plantas trasplantadas sobrevivieron en un 20%. En contraste con esto en otros trabajos como el de Vanegas y col. (2002) y, Misra y Datta (1999) han reportado la aclimatación de hasta el 100% de plantas trabajando con otras variedades de cempaxúchitl y en cámara de crecimiento.

Cuadro 11. Efecto del método de aclimatación *ex vitro* en la supervivencia de plántulas desarrolladas *in vitro*.

Día	Fertilización	(%) supervivencia
2*	medio MS 50%	100
4	medio MS 50%	100
6*	medio MS 25%	100
8	medio MS 25%	80
10*	Solución Steiner	80

El * indica modificaciones en la cubierta plástica en los días 2 y 6; a partir del día 10 la cubierta plástica fue retirada. Se observó un decremento en la sobrevivencia a partir de la segunda modificación de la cubierta plástica posiblemente porque las plántulas que murieron no se adaptaron a condiciones de menor humedad e intercambio gaseoso, y un menor suministro nutrientes.



Figura 10. Aspecto de plántulas de cempaxúchitl desarrolladas *in vitro* aclimatadas a condiciones *ex vitro*.



Desinfección de semillas



Germinación en medio MS



Inducción de brotes



Selección de hoja como explante



Enraizamiento *in vitro*



Aclimatación

Figura 11. Resumen del sistema de regeneración obtenido.

6. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se obtuvo un protocolo para la inducción de callos a partir de explantes foliares de cempaxúchitl y establecer un sistema de regeneración a partir de lo descrito (Figura 11). Algunos de los tratamientos obtuvieron una respuesta aceptable en términos de frecuencia de inducción de callos friables y sin signos de oxidación. En general la formación de callos se produce cuando la concentración del 2,4-D es superior a la de BAP en el medio de forma similar con lo reportado por Ramos en 2007. Además en el tratamiento control no se observa la formación de callos, raíces o brotes, demostrando una interacción promotora de los RCV empleados durante la formación del callo y durante el proceso de organogénesis. La formación del callo se produce cuando se adiciona el mismo nivel de auxinas y citocininas al medio de cultivo (Skoog y Miller, 1957). Por lo tanto la relación entre estos dos reguladores de crecimiento constituye el factor crítico que activa los eventos de desarrollo *in vitro* (Zhao y col., 2008).

La presencia de hormonas en diferentes niveles en las plantas intactas y sus células, permite que estas desarrollen caminos morfogénéticos alternativos muy distintos, los cuales pueden darse de acuerdo al grado de ontogenia. Lo mas general es que las células en crecimiento por acción de varias hormonas expresen división celular y elongación, como es el caso de la inducción de callos en explantes foliares en cempaxúchitl en medio MS suplementado con BAP y 2,4-D. Las auxinas como el 2,4-D promueven la elongación celular principalmente por un aumento de la expansión celular. En general las auxinas estimulan la actividad de la bomba de protones (H^+ ATPasa) a través de dos mecanismos: el primero que es por activación de las H^+ ATPasas preexistentes y la segunda por que inducen la transcripción de genes que codifican nuevas bombas de protones. La extracción de protones hacia la pared celular genera una reducción en el pH (acidificación) lo que a su vez activa enzimas como expansinas y celulasas que rompen enlaces de hidrógeno de los constituyentes de la pared favoreciendo la plasticidad de la célula.

Otras enzimas hidrolíticas actúan posteriormente y las células crecen como resultado de la presión de turgor generada por la vacuola y del ingreso de nuevos materiales, cuya síntesis y deposición también está regulados por las mismas auxinas (Hager, 2003). La aplicación de citocininas como BAP, promueve la progresión del ciclo celular. En primer lugar, a nivel de la fase G1, las citocininas y auxinas, inducen primero la acumulación de ciclinas y por tanto promueven un nuevo ciclo celular (Smith y Atkins, 2002). El efecto combinado de auxinas y citocininas además de la proporción en que estos RCV son suministrados al medio es lo que produce una determinada respuesta morfogénica en los explantes cultivados, como puede ser la inducción de callos, brotes o raíces que es lo que se observa a lo largo de estos experimentos.

Los resultados, se pueden atribuir al hecho de que se ha demostrado recientemente que a pesar de que las auxinas inducen la organogénesis, las citocininas regulan el eflujo de auxinas ya que orquestan la degradación de proteínas acarreadoras específicas de éstas como lo son proteínas de la familia PIN y AUX (Moubayadin y col., 2010).

Durante la selección del explante se observó una mejor respuesta al utilizar explantes foliares, los cuales mostraron una respuesta mayor y más acelerada al formar callos, raíces y brotes en los diferentes medios probados; lo cual es consistente con lo reportado Vanegas y col. (2002) quienes probaron segmentos de hoja, cotiledones y tallos, obteniendo la mejor respuesta al emplear explantes foliares. Esto contrasta con lo reportado por Belarmino y col. (1992) quienes reportaron una mayor formación de brotes al emplear segmentos de hipocotilo en medio suplementado con BAP (4.4 μM) y ANA (2.7 μM). Esta combinación también fue probada durante la selección del explante en callos; estos rediferenciaron pero solo hacia la formación de raíces.

En la producción de los callos se observó que los tratamientos que estaban suplementados con BAP (2.2 μM) y 2,4-D (2.26, 4.52, 6.74 y 9.04 μM) presentaban un mayor porcentaje de inducción que los suplementados con BAP 4.4 μM y las

mismas concentraciones de 2,4-D, lo cual contrasta con lo reportado por García en 2007 y Ríos en 2009, quienes obtuvieron los mejor respuesta al suplementar el medio con concentraciones muy cercanas de BAP y 2,4-D. Hay que resaltar que en los resultados de este experimento se obtuvo el 100% de inducción del proceso de desdiferenciación en explantes foliares de cempaxúchitl después de 13 días de contacto con el medio, valor superior a lo reportado por García en 2007 y Ramos en 2009. De manera general Núñez y Ochoa (1999) han postulado que la obtención de callo es aceptable cuando los niveles de auxinas y citocininas son aproximadamente iguales o muy cercanos, pero esto no es algo generalizado para todas las especies, ya que para la formación de callos en hipocotilos de *Tagetes minuta* también se han reportado niveles más elevadas de auxinas que de citocininas como el mejor tratamiento (Mohamed y col., 1999).

En este trabajo se intentó establecer la rediferenciación de callos utilizando diferentes combinaciones de BAP y AIA, pero estos únicamente continuaban proliferando, solo en un par de tratamiento se logró la rediferenciación de callos, pero solo hacia la formación de raíces, de manera general, se ha descrito que una sola célula es capaz de regenerar una planta completa bajo un balance hormonal adecuado y que cada explante responde de manera diferente a las condiciones *in vitro*, por lo que es posible que se logre la rediferenciación de callos de cempaxúchitl utilizando otro tipo de explantes y RCV para inducir la desdiferenciación y la posterior rediferenciación hacia brotes (Birnbau y Sánchez 2008, Sugimoto y col., 2011).

En la producción de brotes se probaron diferentes combinaciones de BAP y AIA ya que estos reguladores se habían empleado en la regeneración vía organogénesis de cempaxúchitl utilizando hojas (Vanegas y col., 2002) y ápices (Miranda y col., 2006). En este experimento la combinación de BAP (6.6 μM) y AIA (8.5 μM) nos dió un 90% de brotes por explante que es superior a lo reportado por Miranda y col. (2006) quienes reportan un 70% de explantes con brotes utilizando ápices como explantes bajo una combinación de BAP (70 μM) y AIA (10 μM). También se obtuvo una CFB de 3.23 y a pesar de ser una combinación que se

encuentra en la misma proporción pero en menor concentración que la utilizada por Vanegas y col. (2002) quienes reportan una CFB de 2.59 con BAP (13.3 μM) y AIA (17.1 μM) al día 13 utilizando explantes foliares. Esta misma combinación también fue analizada pero se obtuvo una CFB de 0.57. Esto puede deberse a que se utilizaron variedades diferentes de cempaxúchitl o al hecho de que en nuestro experimento los explantes fueron incubados bajo condiciones ambientales mientras que en lo reportado por los autores se incubaron en cámara de crecimiento.

El ensayo de enraizamiento directo *in vitro* nos brindó una pista muy importante para elegir el medio de elongación y enraizamiento para los brotes producidos, ya que para numerosas especies vegetales se emplea el suministro de auxinas exógenas para inducir la formación del sistema radicular en los brotes producidos (Overvoorde y col., 2010). En este experimento observamos que al suplementar el medio MS con auxinas como AIB se alteraba el patrón morfogenético del desarrollo del sistema radicular y se inducían un mayor número de raíces que en el medio MS libre de hormonas, pero las raíces eran adventicias, cortas, pilosas y que no presentaban gravitropismo, fenotipo relacionado con un bajo porcentaje de aclimatación ya que las plántulas con ese tipo de raíces se habitúan en un bajo porcentaje a las propiedades del suelo (Lanteri y col., 2008; Sukumar y col., 2013).

En el experimento de aclimatación *ex vitro* se obtuvo un 80% de sobrevivencia de plántulas desarrolladas *in vitro*. En otros trabajos como el de Misra y Datta (1999) y el de Vanegas y col. (2002) han obtenido el 100% de plántulas aclimatadas pero utilizando otras variedades de cempaxúchitl y bajo otro tipo de condiciones.

7. CONCLUSIONES

- Se diseñó un tratamiento de desinfección de las semillas que asegura la asepsia durante el resto del periodo de cultivo y que no perjudica la germinación.
- Se logró establecer el cultivo celular a partir de explantes foliares de cempaxúchitl. Después de trece días de contacto en medio MS suplementado con BAP 2.2 μM y 2,4-D 6.74 μM se obtuvieron callos friables y que no presentaban signos de oxidación.
- Se desarrolló un método para la aclimatación de plántulas de cempaxúchitl desarrolladas *in vitro*; que asegura el 80% de sobrevivencia de las plántulas bajo condiciones ambientales.
- Mediante el ensayo de enraizamiento directo *in vitro*, se observó que al trasplantar plántulas de cempaxúchitl desarrolladas *in vitro* a medio MS libre de RCV se obtenían plántulas de mayor tamaño y con un sistema radicular mejor desarrollado que las que se cultivaron en medio MS suplementado con AIB.
- Se estableció un sistema para la regeneración de plántulas de cempaxúchitl utilizando explantes foliares, en medio MS suplementado con BAP 6.6 μM y AIA 8.5 μM durante trece días; después los brotes formados se transfirieron a medio MS libre de reguladores de crecimiento para elongación y enraizamiento de las plántulas.

8.REFERENCIAS

Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, *et al.* The *PLETHORA* Genes Mediate Patterning of the Arabidopsis Root Stem Cell Niche. *Cell*. **2004**: 119(1); 109-120.

Ammirato PV. Organizational events during somatic embryogenesis. En *Plant Tissue and Cell Culture*. Green CE, Somers AD, Hackett WP, Bioesboer DD. En Nueva York. Ed. Alan R. Liss, Inc., **1987**: 57-81

Ammirato PV. Patterns of development in culture. En: *Tissue Culture in Forestry Agriculture*. Henke RR, Hughes KW, Constantin MP, Hollaender A. En Nueva York, EUA. Ed. Plenum Press, **1985**: 9-29.

Arroo RR, Jacobs JJMR, De Koning EAH, De Waard M, van de Westerloo E, Van Galen PM, Swolfs AEM, Klunder AJH, Croes AF. Tiophene interconversions in *Tagetes patula* hairy-root cultures. *Phytochemistry*. **1995**: 38; 1193-1197.

Arroo RR, Jacobs JJMR, van Gestel JAM, Henkel H, Jannink W, Croes AF, Wullems GJ. Regulation of tiophene biosynthesis by sulphate in roots of marigold. *New Phytologist*. **1997**: 135; 175-181.

Belarmino MM, Abe T, Sasahara T. Callus induction and plant regeneration in African marigold (*Tagetes erecta* L). *Japanese Journal of Breeding*. **1992**:42; 835-841.

Bespalhok JC, Hattori IK. Friable embryogenic callus and somatic embryo formation from cotyledon explants of African marigold (*Tagetes erecta* L). *Plant Cell Reports*. **1998**: 17; 870-875.

Biddington NL. The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant growth regulation*. **1992**. 11(2); 173-187

Birnbaum KD, Sánchez Alvarado A. Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals. *Cell*. **2008**:132; 697–710.

Bleecker AB. Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **2000**: 16; 1-18.

Che P, Lall S, Nettleton D, Howell SH. Gene expression programs during shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture. *Plant Physiol*. **2006**: 141; 620–637

Cheng ZJ, Wang L, Sun W, Zhang Y, Zhou C, Su YH, *et al*. Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. *Plant physiology*. **2013**:161(1); 240-251.

Croes AF, Jacobs JJNR, Arroo RRJ, Wulems GJ. Tiophene biosynthesis in *Tagetes* root: molecular vs metabolic regulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **1994**: 38; 159-165.

Cruz-Hernández A. Producción de embriones somáticos transformados en mango y aguacate. Tesis doctoral. CINVESTAV, IPN. Irapuato, Guanajuato. **1998**: 10-52.

Cruz-Ramírez A, Díaz-Triviño S, Blilou I, Grieneisen VA, Sozzani R, Zamioudis C, *et al*. A bistable circuit involving SCARECROW-RETINOBLASTOMA integrates cues to inform asymmetric stem cell division. *Cell*. **2012**: 150 (5); 1002-1015.

Cutler S, Rodríguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR. Abscisic acid: emergence of a core signal network. *Annual Reviews of Plant Biology*. **2010**.61; 651-679.

Davies PJ. *Plant hormones, biosynthesis, transduction, action!*. 3^a edición . Dordrecht, Holanda: Kluwer academic publishers, **2010**; 1-5.

Delgado-Vargas F, Paredes-López O. Correlation of HPLC and AOAC methods to assess the all-trans-lutein content in marigold flowers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1996**: 72(3); 283-290.

Delgado-Vargas F, Paredes-López O. Effects of enzymatic treatments on carotenoid extraction from marigold flowers (*Tagetes erecta*). Food Chemistry. **1997**: 58 (3); 255-258.

Delgado-Vargas F, Jiménez-Aparicio AR, Paredes-López, O. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins and betalains. Characteristics, biosynthesis, processing and stability. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. **2000**: 40; 173-289.

Dewitte W, Riou-Khamlichi C, Scofield S, Healy JM, Jacquard A, Kilby NJ, Murray, JA. Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in Arabidopsis caused by the D-type cyclin CYCD3. Plant Cell. **2003**: 15; 79–92.

Doran PM. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations. Biotechnology and Bioengineering. **2009**: 130(1); 60-76.

Ferrie AMR, Caswell KL. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell Tissue and Organ Culture. **2011**: 104(3); 301-309.

Fujimura T. Carrot Somatic Embryogenesis.: A dream come true? Plant Biotechnology Reports. **2013**: 1-6.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research. **1968**: 50; 151-158.

García-Chavarría, M. Expresión transitoria del gen *uidA* en células de *Tagetes erecta*. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos CEPROBI-IPN. Yauhtepec, Morelos. **2007**; 14-16.

Gautheret R. Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. C. R. Soc. Biol. Paris. **1939**: 208; 118–120.

George EF, Hall MA, Klerk JD. Plant propagation by tissue culture. 3a edición. En: Dordrecht Holanda, **2008**. vol.1, 1-23.

Gordon SP, Chickarmane VS, Ohno C, Meyerowitz EM. Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *PNAS*. **2009**: 106; 16529–16534.

Gordon SP, Heisler MG, Reddy GV, Ohno C, Das P, Meyerowitz EM. Pattern formation during de novo assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development*. **2007**: 134; 3539–3548.

Goren R, Altman A, and Giladi I. Role of ethylene in abscisic acid-induced callus formation in citrus bud cultures. *Plant Physiol*. **1979**: 63; 280–282.

Guzman SH, Paredes O. Functional product of plants indigenous to Latin America: Amaranth, quinoa, common beans, and botanical. En: *Functional Foods. Biochemical and processing aspect*. G, Mazza, Ed. Technomic Publishing Lancaster, Pennsylvania. **1998**.

Gutiérrez, C. Células madre vegetales. *Investigación y ciencia*. **2012**: 56-65.

Haberer G, Kieber JJ. Cytokinins. *New Insights in to Classic Phytohormone*. *Plant Physiology*. **2002**: 128; 354-362.

Haberlandt G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen Sitzungber. *Akad Wiss Wien Math-Naturwiss*. **1902**: 111; 69-92.

Hof K, West C, Weststrate J, Hautvast J. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *Journal of Nutrition*. **2000**: 130; 503-506.

Hu Y, Bao F, Li J. (2000). Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. **2000**: 24; 693–701.

Huang LC, Murashige T. Plant tissue culture media: major constituents, their preparation and some applications. *TCA Manual*. **1968**: vol.3, No 1.

Hurtado D, Merino ME. *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Trillas, México. **1998**; 93-98.

Hwan I, Sheen J, Müller B. Cytokinin Signaling Networks. Annual Review of Plant Biology. **2012**: 63; 353-380.

Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A. Plant callus: Mechanisms of Induction and Repression. The Plant Cell. **2013**: 26; 1-15.

Iwase A, Ohme-Takagi M, Sugimoto K. WIND1: A key molecular switch for plant cell dedifferentiation. Plant Signal. Behav. **2011**: 6; 1943–1945.

Jacobs JJ, Arroo RR, De Koning EA, Klunder AJ, Croes AF, Wullems GJ. Isolation and characterization of mutants of thiophene synthesis in *Tagetes erecta*. **1995**. Plant physiology: 107; 807-814.

Karuppusami S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell culture. Academic Journal. **2009**:3(13); 1222-1239.

Kothari SL, Chandra N. *In vitro* propagation of African marigold. Hort Science. **1984**: 19; 703-705.

Lanteri ML, Laxalt AM, Lamattina L. Nitric oxide triggers phosphatidic acid accumulation via phospholipase D during auxin-induced adventitious root formation in cucumber. Plant Physiology. **2008**: 147(1); 188-198.

Litz RE, Jarret RL. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis. En: cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Roca WM, Mroginski LA. Eds. CIAT Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. **1991**; 143-171.

Malamy JE, Benfey PN. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. Development. **1997**: 124; 33-44.

Martínez C, Harry IS, Thorpe TA. Optimization of bud induction in cotyledonary explants of *Pinus canariensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. **1992**: 29; 247-255.

Massera PE, Rodriguez J, Giulietti AM. Thiophene production in transformed roots cultures of *Tagetes filifolia*. Biotechnology letters. **1998**: 20; 573-577.

Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgens G, Laux T. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. Cell. **1998**: 95; 805–815

Miranda-Ham ML, Castro-Concha LA, Ávilez-Berzunza E, Godoy-Hernández G. Plant Regeneration from Shoot Apex-Derived in Calluses of Marigold (*Tagetes erecta* L.). HortScience. **2006**: 41(6); 1518-1520.

Misra P, Datta SK. Direct differentiation of shoots buds in leaf segments of white marigold (*Tagetes erecta* L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant. **2001**:37; 366-470.

Misra P, Datta SK. *In vitro* propagation of white marigold (*Tagetes erecta* L.) through shoot tip proliferation. Current Science. **1999**: 77; 1138-1140.

Mohamed MAH, Harris PJC, Henderson J. An efficient *in vitro* regeneration protocol for *Tagetes minuta*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. **1999**: 55; 211-215.

Moubayadin, L, Di Mambro R, Sabatini S. Cytokinin and auxin crosstalk. Trends in plant science. **2009**: 14(10); 557-562.

Mroginski Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Echenique, V.; Rubinstein, C. y Mroginski, L., Eds. Ediciones INTA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. **1991**; 35-42.

Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. **1962**:15; 472-497.

Myerson J, Krull W R. Stability of growth and morphological changes in *Gymura aurantiaca* plants regenerated from callus. Hortscience. **1982**: 17(1); 80-82.

Nagata T, Takebe I. Plating of Isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta*. **1971**: 99; 12-20.

Nakajima K, Sena G, Nawy T, Benfey PN. (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature*. **2001**: 413(6853); 307-311.

Nambara E, Marian-Poll A. Abscic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*. **2005**: 56; 165-185.

Neely D. Tree wounds and wound closure. *Journal of Arboriculture*. **1979**: 5; 135-140.

Nobécourt P. Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *Compt. Rendus Soc. Biol. Lyon*. **1939**: 130;1270–1271.

Nuñez-Pelanius HG, Ochoa-Alejo N. In Vitro mass cultivation of cells and tissues. En: *Molecular biotechnology for plants food production*. Páredes-López O. Ed: Technomic publishing, Pennsylvania, **1999**. 89-130.

Olmos S, Luciane G, Galdeano E. Micropropagación. En: *Biología y Mejoramiento Vegetal*. Echenique V, Rubinstein C, Mroginski L. Eds. Ediciones INTA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. **2004**; 161-172.

Osman HA, Taha HS, Youssef MMA, El Gindi AY, Ameen HH, Lashein AMS. Establishment of calli cultures from different explants of *Tagetes erecta* and *T. patula*. *Journal of applied sciences research*. **2012**: 8; 3850-3854.

Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T. Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biolog*. **2010**: 2(6); 1-16.

Pérez-Molphe EM, Ramírez-Malagón R, Núñez-Pelanius HG, Ochoa-Alejo N. *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. Universidad de Aguascalientes, Aguascalientes, México. **1999**.

Pospisilova, Synkova H, Rulcava J. Cytokinins and wáter stress. *Biologia Plantarum*. **1999**: 43(3); 321-328.

Ramos-Viveros V. Análisis ultraestructural de células desdiferenciadas de cempaxúchil (*Tagetes erecta*). Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Puebla, **2007**: 5-16.

Redenbough K, Paasch BD, Nichol JW, Kossler ME, Viss PR, Walker KA. Somatic sedes: Encapsulation of Asexual Plant Embryos. *Nature Biotechnology*. **1986**: 797-781.

Rios-Salomé LB. Caracterización morfológica de los procesos de desdiferenciación y rediferenciación de explantes foliares de cempaxúchitl. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, IPN. Yautepec, Morelos, **2009**: 6-16.

Roca WM, Mroginski LA. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En: *Cultivo de Tejidos Vegetales en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Roca WM, Mroginski LA. Eds. CIAT Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. **1991**: 1-17.

Rodriguez-Talou J, Cascones O, Giulietti AM. Content of thiophenes in transformer root cultures of argentinian species of *Tagetes*. *Planta Medica*. **1994**: 60; 260-262.

Roodembury A, Leenen R, Hof K. Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of alfa-carotene, beta-carotene, and vitamin E in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. **2000**: 71; 1187-1193.

Rzedowski GC, Rzedowski JD. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., 1a reimp. Pátzcuaro, Michoacán: Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, **2005**. vol. III: 921-922.

Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B. SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes and development*. **2003**:17(3); 354-358.

Saini S, Sharma I, Kaur N, Pati PK. Auxin a master regulator in plant root development. *Plant Cell Reports*. **2013**: 32(6); 741-757.

SIAP. Cempazúchitl cultivo redituable [monografía en internet]. Distrito Federal: SAGARPA, **2012** [consultado 2013 enero 23]. Disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/infografias/Paginas/cempazuchitl.aspx>

Skoog F, Miller CO. Chemical regulation of growth organ and organ formation in plant tissue culture *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. **1957**:11; 118–131.

Sowbhagya HB, Sushma SB, Rastogi NK, Naidu MM. Effect of pretreatments on extraction of pigment from marigold flower. *Journal of Food Science and Technology*. **2013**: 50; 122-128.

Steward FC, Mapes MO, Mears K. Growth and organized development of culture cells II. Organization in culture grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*. **1958**; 705-708.

Styer DJ, Chin CK. Meristem and shoot- tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm preservation. *Horticulture review*. **1983**: 5; 221-277.

Sugimoto K, Gordon SP, Meyerowitz EM. Differentiation in animals and plants: dedifferentiation, transdifferentiation or just differentiation. *Trends in cell biology*. **2011**: 21(4); 212-218.

Sugiyama, M. Organogenesis *in vitro*. *Plant Biology*. **1999**: 2; 61-64.

Sukumar P, Maloney G, Muday GK. Localized induction of the ABCB19 auxin transporter enhances adventitious root formation in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. **2013**: 113; 174-217.

Thorpe TA. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. *International Review of Cytology Supplement*. **1980**: 11A; 71-111.

Tisserat B, Essan EB, Murashige T. Somatic embriogénesis in angiosperms. Horticultural Reviews **1979**: 1; 1-78.

Vanegas-Espinoza PE, Cruz-Hernández A, Valverde ME, Paredes-López O. Plant regeneration via organogenesis in marigold. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. **2002**: 69:279-283.

Vanneste S, Friml J. Auxin a trigger for change in plant development. Cell. **2009**: 136: 1005-1016.

Vasudevan P, Kashyap S, Sharma S. Tagetes: A multipurpose plant. Bioresource technology. **1997**: 62; 29-35.

Villalobos A. Plantas libres de virus. Ciencia y Desarrollo CONACyT (México). **1980**: 33; 35-39.

Villalobos VM, Thorpe TA. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Roca W. M. y Mroginski L. A., Eds. CIAT Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. **1991**; 127-141.

von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L. Developmental pathway of somatic embryogenesis. **2002**: 69; 233-249.

Weiss D, Ori N. Mechanisms of cross talk between gibberellins and other hormones. Plant physiology. **2007**: 144; 1240-1246.

West C. Meeting requirements for vitamin A. Nutrition Reviews. **2000**:58; 341-345.

Yamaguchi S. Gibberellin Metabolism and its Regulation. Annual Review of Plant Biology. **2008**: 59; 225-251.

Zhao XY, Cheng ZJ, Zhang XJ. Cell fate switch during *in vitro* plant organogénesis. Journal of Integrative Plant Biology. **2008**: 50 (7); 816-824.

ANEXOS

Perspectivas del trabajo:

- El conocimiento generado en este trabajo genera una alternativa para los trabajos encaminados a la transformación genética en cempaxúchitl.
- Posibilita la obtención de metabolitos secundarios de interés biotecnológico en cultivos celulares *in vitro* bajo condiciones controladas.
- Identificar y cuantificar los metabolitos secundarios producidos en cultivo celular y plantas de cempaxúchitl mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas.
- Probar combinaciones de BAP y ANA para la regeneración vía organogénesis a partir de explantes foliares.
- Probar tratamientos con 2,4-D, TDZ, dicamba y picloram en diferentes explantes de cempaxúchitl para inducir el proceso de embriogénesis somática como vía de regeneración.
- Establecer las condiciones para el cultivo celular de variedades de cempaxúchitl sobre-productoras de carotenoides.
- Validar el protocolo de regeneración obtenido en otras variedades de cempaxúchitl.
- Ensayar la transformación genética de explantes foliares de cempaxúchitl con la secuencia del gen que codifica para la proteína verde fluorescente.

Preparación de medios y soluciones.

A continuación se describen los medios de cultivo y soluciones utilizadas en cada método.

A. Medios de cultivo.

1. Medio MS para germinación

Volumen: 1L

Solución de macronutrientes MS (10X)	100 ml
Solución de micronutrientes MS (10X)	100 ml
Solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (100X)	10 ml
Solución de vitaminas MS (1000X)	1 ml
Mio-inositol	100 mg
Sacarosa	30 g
Agar	8 g

Disolver en 700 ml de agua destilada estéril la cantidad de sacarosa y mio-inositol a si como el volumen de las soluciones de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y sulfato ferroso – sodio EDTA; ajustar el pH a 5.8, adicionar el agar y aforar a 1 L. Esterilizar a 15 psi.

2. Medio MS para inducción de callos

Volumen: 1L

Solución de macronutrientes MS (10X)	100 ml
Solución de micronutrientes MS (10X)	100 ml
Solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (100X)	10 ml
Solución de vitaminas (1000X)	1 ml
Mio-inositol	100 mg
Solución de 2,4-D (1mg/ml)	1498 μl
Solución de BAP (1 mg/ml)	495 μl
Solución de ácido ascórbico (35 mg/ml)	1 ml
Sacarosa	30 g
Fitagel	3 g

Disolver en 700 ml de agua destilada estéril la cantidad de sacarosa y mio-inositol a si como el volumen de las soluciones de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, sulfato ferroso – sodio EDTA, 2,4-D y BAP; ajustar el pH a 5.8, adicionar el fitagel y aforara 1L. Esterilizar el medio a 15 psi. Después de esterilizar el medio, dejar enfriar el medio en condiciones ambientales y una vez que este alcance una temperatura entre los 50-60 °C adicionar el ácido ascórbico. Finalmente verter 20 ml del medio por caja Petri.

3. Medio MS para producción de brotes en callos como explantes

Volumen: 1L

Solución de macronutrientes MS (10X)	100 ml
Solución de micronutrientes MS (10X)	100 ml
Solución de vitaminas (1000X)	1 ml
Solución de FeSO ₄ ·7 H ₂ O y Na ₂ -EDTA (100X)	10 ml
Mio-inositol	100 mg
Solución de ANA (1 mg/ml)	201.5 µl
Solución de BAP (1 mg/ml)	990 µl
Solución de ácido ascórbico (35 mg/ml)	1 ml
Sacarosa	30 g
Fitagel	3 g

Disolver en 700 ml de agua destilada estéril la cantidad de sacarosa y el volumen de las soluciones de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, sulfato ferroso – sodio EDTA, ANA y BAP; ajustar el pH a 5.8, adicionar fitagel y aforar a 1L. Esterilizar el medio a 15 psi. Después de esterilizar el medio, dejarlo enfriar en condiciones ambientales y una vez que alcance una temperatura entre los 50-60 °C adicionar el ácido ascórbico. Finalmente verter 20 ml del medio por caja Petri.

4. Medio MS para inducción de brotes en explantes foliares.

Volumen: 1L

Medio MS sólido (Sigma-Aldrich)	4.4 g
Solución de AIA (1 mg/ml)	1490 µl
Solución de BAP (1 mg/ml)	1490 µl
Solución de ácido ascórbico (35 mg/ML)	1 ml
Sacarosa	30 g
Fitagel	3 g

Disolver en 700 ml de agua destilada estéril la cantidad de sacarosa y medio MS y el volumen de las soluciones de AIA y BAP; ajustar el pH a 5.8, adicionar fitagel y aforar a 1L. Esterilizar el medio a 15 psi. Después de esterilizar el medio, dejarlo enfriar en condiciones ambientales y una vez que alcance una temperatura entre los 50-60 °C adicionar el ácido ascórbico. Finalmente verter 20 ml del medio por caja Petri.

B. Soluciones para preparar medio de cultivo.

1. Macronutrientes MS (Stock 10X)

Nitrato de potasio	19 g
Nitrato de amonio	16.5 g
Cloruro de calcio dihidratado	3.322 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	3.7 g
Fosfato de potasio monobásico	1.7 g

2. Micronutrientes MS (Stock 10X)

Sulfato de manganeso hidratado	169 mg
Sulfato de zinc heptahidratado	86 mg
Ácido bórico	62 mg
Yoduro de potasio	8.3 mg
Sulfato cúprico pentahidratado	0.25 mg
Ácido molíbdico sal de sodio dihidratado	2.5 mg
Cloruro de cobalto hexahidratado	0.25 mg

3. Solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Na_2EDTA (Stock 100X)

Sulfato ferroso heptahidratado	2.78 g
Sodio EDTA	3.73 g

Modo de preparación de un 1L de solución 100X:

- i) Disolver los 3.73 g de Na_2EDTA en 900 ml de agua desionizada estéril. Dejar durante 20 min a temperatura ambiente y se obtiene una solución clara.
- ii) Agregar gradualmente los 2.78 g de sulfato ferroso heptahidratado y se obtiene una solución color amarillo claro inmediatamente.
- iii) Guardar la solución de quelato de hierro en una botella ámbar y evitar su exposición a la luz.
- iv) Usar 10 ml de la solución preparada para un 1L de medio de cultivo.

4. Solución de vitaminas (Stock 1000X)

Ácido p-aminobenzoico	20 mg
Ácido L-ascórbico	2 g
Biotina	10 mg
Pentotenato de calcio	1 g
Cloruro de colina	1 g
Ácido fólico	400 mg
Nicotinamida	1 g
Piridoxina·HCl	1 g
Riboflavina	200 mg
Tiamina·HCl	1 g
Vitamina A (Retinol)	10 mg
Vitamina B ₁₂	20 mg
Vitamina D (Colecalciferol)	10 mg

La preparación de la solución de mezcla de vitaminas se realiza a partir de los componentes individuales envasados en polvo. Estos son higroscópicos por lo cual hay que protegerlos de la humedad atmosférica. El contenido de cada envase debe utilizarse inmediatamente después de abrir. Los pasos básicos para preparar la solución stock de vitaminas 1000X se enumeran a continuación:

- i) Medir el 70% del volumen final requerido de agua desionizada estéril (por ejemplo para 1L de solución medir 700 ml).
- ii) Agitar el agua mientras se agrega la mezcla de vitaminas. Agitar hasta que la mezcla este completamente disuelta. El aumento en la

temperatura o en el pH puede ser requerido para la completa disolución de la mezcla.

- iii) Aforar hasta el volumen final.
- iv) Agregar 1 ml de la solución resultante para preparar 1L de medio de cultivo.

C. Soluciones stock de RCV.

1. BAP (1 mg/ml)

Disolver 100 mg de BAP en 500 μ l de HCl 1N o KOH 1N y aforar a 100 ml con agua desionizada estéril. Almacenar a 4 °C.

2. 2,4-D (1 mg/ml)

Disolver 100 mg de 2,4-D en 20 ml de etanol absoluto anhidro aforar a 100 ml con el mismo. Almacenar a 4°C.

3. AIB (1 mg/ml)

Disolver 100 mg de AIB en 1 ml de NaOH 1N . Añadir muy lentamente, agua desionizada estéril hasta llegar a 100 ml. Almacenar a 4 °C.

4. AIA (1 mg/ml)

Disolver 100 mg de AIA en 2 ml de solución NaOH 1 N más 1 ml de etanol absoluto anhidro. Colocar la solución en una botella ámbar y cubierta con aluminio. Almacenar a 4°C en oscuridad.

5. ANA (1 mg/ml)

Disolver 100 mg de ANA en 1 ml de NaOH 1N. Añadir muy lentamente, agua desionizada estéril hasta llegar a 100 ml. Almacenar a 4 °C.

D. Soluciones para ajustar el pH en los medios de cultivo.

1. Solución de NaOH 0.1N

Para preparar un 1L de solución medir el 25% del volumen final requerido de agua desionizada estéril (Si es para 1L medir 250 ml con una probeta graduada). Luego adicionar 4 g de perlas de NaOH. Agitar hasta que las perlas queden bien disueltas. Finalmente aforar a 1L y almacenar a temperatura ambiente.

2. Solución de HCl 0.1N

Para preparar un 1L de solución medir el 50% del volumen final requerido de agua desionizada estéril (Si es para 1L medir 500 ml con una probeta graduada). Luego adicionar muy lentamente 8.37 ml de la solución de HCl concentrado (36% p/p). Aforar a 1L y almacenar a temperatura ambiente.