

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE AGRONOMIA**  
**PROGRAMA DE ESTUDIOS EN POSTGRADO**  
**MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS**

**RESPUESTA A LA MICROPROPAGACION DE LA ESPECIE ENDÉMICA DE**  
**GUATEMALA, *Hoffmania sessilifolia* L.**

**AURA ELENA SUCHINI FARFÁN**

**GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2006.**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE ESTUDIOS EN POSTGRADO  
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS**

**RESPUESTA A LA MICROPROPAGACION DE LA ESPECIE ENDÉMICA DE  
GUATEMALA, *Hoffmania sessilifolia* L.**

TESIS SOMETIDA A LA CONSIDERACION DE LA HONORABLE JUNTA  
DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN  
CARLOS DE GUATEMALA , PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS.

**AURA ELENA SUCHINI FARFÁN**

**GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2006.**

**ESTA TESIS FUE ACEPTADA POR EL CONSEJO ACADEMICO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA Y APROBADA POR EL COMITÉ ASESOR DE LA INVESTIGACIÓN, COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS.**

M.Sc. Héctor Sagastume Mena  
Asesor Principal

M.Sc. Sergio Melgar Valladares  
Asesor Adjunto

M.Sc. Domingo Amador Pérez  
Asesor Adjunto

M.Sc. Domingo Amador Pérez  
Coordinador de la Maestría

M.Sc. Edgar Franco Rivera  
Director del Programa de  
Estudios de Postgrado

Ph.D. Ariel Abderraman Otíz  
DECANO  
Imprímase

Guatemala, noviembre de 2006.

### **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro de Estudios Conservacionistas –CECON- por haber permitido la colecta de plantas en el Biotopo Universitario para la Conservación del Quetzal Mario Dary Rivera.

Al Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas – ICTA- por haber proporcionado los reactivos y el equipo necesario para la ejecución de esta investigación.

Al MSc. Ing. Héctor Sagastume y al MSc. Sergio Melgar por su asesoría y apoyo.

Al Ing. Julio Franco por su colaboración en la toma de fotografías e impresión de las mismas.

Al Ing. Luis Molina por permitirme realizar esta investigación en el laboratorio a su cargo, y por su colaboración

| Al Ing. Byron de la Rosa por la revisión ortográfica del documento.

## CONTENIDO

		Página
	INDICE GENERAL	iii
	INDICE DE CUADROS	v
	INDICE DE FIGURAS	vi
	GLOSARIO DE TERMINOS	viii
I	RESUMEN	1
II	INTRODUCCION	3
III	DEFINICION DEL PROBLEMA	3
IV	OBJETIVOS	4
V	ANTECEDENTES	4
1	Descripción botánica de la especie <i>Hoffmania sessilifolia</i> L.	4
2	Usos	6
3	Endemismo	7
4	Estudios realizados	7
5	Principios generales	9
5.1	El explante	9
5.2	La asepsia	11
5.3	Los medios de cultivo	13
5.3.1	Componentes del medio de cultivo	14
5.3.2	Preparación del medio de cultivo	39
5.4	Condiciones ambientales para la incubación	40
5.5	Embriogénesis somática	42
5.5.1	Embriogénesis directa o indirecta	43
5.6	Morfogénesis	44
<u>5.7</u>	Usos más frecuentes del cultivo de tejidos	46
<u>5.8</u>	Perspectivas	47
<u>5.9</u>	Efectos del genotipo	48
<u>5.10</u>	Efectos de posición y competencia	48
VI	METODOLOGIA	49
1	Selección de especies a conservar inicialmente	49
2	Obtención de muestras de plantas endémicas en los lugares reportados del país	50
3	Tratamiento de muestras.	50
4	Esterilización de cristalería, soluciones y medios de cultivo	50
5	Determinación del medio más adecuado para el establecimiento de plántulas a través de la siembra de ápices.	50
6	Evaluación de 3 métodos de desinfección en el desarrollo de Microestacas	53
7	Evaluación de 4 concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo de microestacas.	54
8	Determinación del medio más adecuado para el establecimiento de plántulas a través de la siembra de microestacas.	54
9	Organogénesis Directa e Indirecta	55
9.1	Organogénesis Directa	55
9.2	Organogénesis Indirecta	56

Con formato: Numeración y viñetas

	Página	
9.2.1	Desarrollo de Callo	56
9.2.2	Desarrollo de plántulas	57
10	Otros experimentos realizados para obtener plántulas	58
10.1	Medio WPM conteniendo diferentes concentraciones de ANA y BAP	58
10.2	Medio WPM conteniendo 1mg/l de BAP y 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 y 0.1 mg/l de ANA.	59
10.3	Medio WPM conteniendo diferentes concentraciones de ácido absísico (ABA)	59
11	Aclimatación de plántulas obtenidas <i>in vitro</i> .	60
VII	RESULTADOS Y DISCUSION	61
1	Determinación del medio más adecuado para el establecimiento de plántulas a partir de la siembra de ápices	61
2	Evaluación de tres métodos de desinfección en el desarrollo de microestacas.	62
3	Evaluación de cuatro concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo de microestacas.	62
4	Determinación del medio más adecuado para el establecimiento de plántulas a través de la siembra de microestacas.	64
5	Organogénesis directa	66
6	Organogénesis indirecta	68
6.1	Obtención de callo	68
6.2	Obtención de plántulas	68
7	Otros experimentos realizados para obtener plántulas	70
7.1	Medio WPM conteniendo diferentes concentraciones de ANA y BAP	70
7.2	Medio WPM conteniendo 1 mg/l de BAP y 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 y 0.1 mg/l de ANA	72
7.2.1	Callo	72
7.2.2	Porciones de hoja, tallo u hoja completa	72
7.3	Medio WPM conteniendo diferentes concentraciones de ácido absísico (ABA).	77
8	Aclimatación de plántulas obtenidas <i>in vitro</i> .	77
VIII	CONCLUSIONES	78
IX	RECOMENDACIONES	80
X	BIBLIOGRAFIA	81
XI	ANEXOS	83

**INDICE DE CUADROS**

	PÁGINA	
Cuadro 1	Número de tubos sembrados con porciones de hoja, hoja completa y tallo en diferentes concentraciones de ANA y BAP.	58
Cuadro 2	Crecimiento de plántulas provenientes de ápices en medio WPM sin regulador de crecimiento.	61
Cuadro 3	Crecimiento de plántulas provenientes de microestacas en medio MS conteniendo 10, 20, 30 y 40 mg/l de BAP.	64
Cuadro 4	Crecimiento de plántulas provenientes de microestacas en medio WPM sin regulador de crecimiento.	65
Cuadro 5	Crecimiento de plántulas provenientes de microestacas en medio MS sin regulador de crecimiento.	65
Cuadro 6	Número de explantes que desarrollaron callo en las diferentes concentraciones de ANA y BAP utilizadas.	70
Cuadro 7	Número de explantes que desarrollaron plántulas en las diferentes concentraciones de ANA y BAP utilizadas.	72

## INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Plantas de <i>Hoffmania sessilifolia</i> en el bosque nuboso del Biotopo Mario Dary para la Conservación del Quetzal.	5
Figura 2a y 2b	Apices sembrados en medio WPM sin regulador de crecimiento.	63
Figura 3a y 3b	Microestacas sembradas en medio WPM.	63
Figura 3c y 3d	Microestacas sembradas en medio WPM	67
Figura 4a y 4b	Callo formado en los bordes de porciones de hoja en medio WPM con diferentes concentraciones de 2iP.	67
Figura 5a y 5b	Callo obtenido de porciones de hoja en medio T1 conteniendo 1 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de 2iP.	69
Figura 6a	Callo formado en hojas completas sembradas en medio WPM con diferentes concentraciones de ANA y BAP.	69
Figura 6b	Callo formado en una porción de tallo sembrada en medio WPM conteniendo diferentes concentraciones de ANA y BAP.	69
Figura 7a	Plántulas desarrolladas a partir del callo formado en un medio WPM conteniendo 2.5 mg/l de ANA y 2.5 mg/l de BAP.	73
Figura 7b	Plántula desarrollada a partir del callo formado en la base de la hoja completa en medio WPM conteniendo 2.5 mg/l de ANA y 2.5 mg/l de BAP.	73
Figura 8	Plántula formada a partir del callo en medio WPM conteniendo 5 mg/l de BAP y 5 mg/l de ANA.	73
Figura 9	Plántula formada a partir del callo en medio WPM conteniendo 10 mg/l de BAP y 10 mg/l de ANA.	73
Figura 10	Plántula desarrollada a partir del callo formado en la base de una hoja completa en medio WPM conteniendo 10 mg/l de BAP y 20 mg/l de ANA.	74
Figura 11	Plántula desarrollada a partir del callo formada en la base de una hoja completa en medio WPM conteniendo 2.5 mg/l de ANA.	74
Figura 12a	Plántula formada a partir de callo en medio WPM conteniendo 5 mg/l de ANA.	74
Figura 12b	Plántula formada a partir del callo formado en la base de una hoja en medio WPM conteniendo 5 mg/l de ANA.	74

**INDICE DE FIGURAS**

		Página
Figura 13	Plántula desarrollada a partir de callo en medio WPM conteniendo 5 mg/l de BAP y 10 mg/l de ANA.	75
Figura 14a	Plántula desarrollada a partir de una porción de tallo en medio WPM conteniendo 1 mg/l de BAP y 0.07 mg/l de ANA.	75
Figura 14b	Plántula formada a partir de una porción de hoja en medio WPM conteniendo 1 mg/l de BAP y 0.07 mg/l de ANA.	75
Figura 15	Plántula desarrollada a partir del callo formado en la base de la hoja en medio WPM conteniendo 1 mg/l de BAP y 0.075 mg/l de ANA.	75
Figura 16a y 16b	Plántulas desarrolladas a partir de porciones de hoja en medio WPM conteniendo 2.5 y 5 mg/l de ABA.	76

**GLOSARIO DE TERMINOS**

ABA	ácido absícico
Agrimycin	estreptomicina15%, terramicina(oxitetraciclina)1.5%
AIB	ácido indolbutírico
ANA	ácido naftalenacético
BAP	bencilaminopurina
Derosal	metil-2-benzimidazol-carbamato
KIN	kinetina
MS	Murashige y Skoog
PVP	Polivinil pirrolidona
WPM	Woody plant media
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	6-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallylamino)purina

## I. RESUMEN

Las regiones de mayor endemismo del país están situadas en: Sierra de los Cuchumatanes, Sierra de las Minas, Cadena Volcánica, Alta y Baja Verapaz e Izabal. Actualmente, por el avance de la frontera agrícola y por la deforestación, todas ellas se encuentran presionadas a la extinción; la existencia de áreas protegidas y la creación de nuevas áreas no es suficiente, se hace necesario crear otras alternativas para no perder los recursos de importancia ecológica mundial. La especie *Hoffmania sessilifolia* L., es una de las 1171 especies de plantas endémicas reportadas para Guatemala; su distribución únicamente abarca al municipio de Purulhá, Baja Verapaz.

Una alternativa para la conservación de los recursos naturales es la conservación *in vitro*. Con esta investigación se pretendió desarrollar una metodología para propagar esta especie endémica; determinando el medio de cultivo más adecuado para el desarrollo de ápices y microestacas; estudiando la influencia de cuatro concentraciones de bencilaminopurina (BAP) sobre el desarrollo de las microestacas; así también, conocer la influencia de dos diferentes concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallylamino)purina (2iP) sobre el desarrollo de callo a partir de porciones de hoja y determinando el medio de cultivo más adecuado para el desarrollo de plántulas a partir de segmentos de hoja, tallo y de callo.

Se logró la propagación de la especie por ápices y microestacas. El medio WPM sin reguladores de crecimiento fue el medio que brindó el crecimiento más rápido; reportando una tasa de propagación en ápices de dos plántulas por mes y en microestacas de 3.5 plántulas. Además, el medio WPM desarrolló raíces en el 80 por ciento de las plántulas sembradas respecto al medio MS el que proporcionó desarrollo de raíces en el 60% de las plántulas.

De cuatro concentraciones de BAP (10, 20, 30 y 40 mg/l) utilizadas en el desarrollo de las microestacas, la concentración de 30 mg/l permitió el crecimiento de tres centímetros en las plántulas, en el lapso de un mes estas desarrollaron cinco ramificaciones con tres nudos cada una. Mientras que en concentraciones de 10 y 20 mg/l las plántulas crecieron 0.96 y 1.4 centímetros, respectivamente, desarrollando cuatro ramificaciones y de uno a dos nudos en cada ramificación.

El desarrollo de plántulas por organogénesis directa se observó en porciones de hoja, sembradas en medio WPM conteniendo 2.5 y 5 mg/l de ácido absícico (ABA), luego de transcurridos dos meses. También, una concentración de 1 mg/l de BAP y 0.07 mg/l de ANA en medio WPM indujo la formación de plántulas en porciones de hoja y tallo en un lapso de dos meses.

El medio T1 conteniendo 1 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de 2iP propició el desarrollo de callo en porciones de hoja en un período de un mes; así mismo, el medio WPM conteniendo concentraciones de 2.5, 5, 10 y 20 mg/l de ANA y 2.5, 5 y 10 mg/l de

BAP permitió el desarrollo de callo en porciones de hojas, tallo y hoja completa en un período de 23 días.

Se obtuvieron plántulas por organogénesis indirecta en medio WPM conteniendo 5 mg/l de ANA; 2.5 mg/l de ANA y 2.5 mg/l de BAP y 5 mg/l de ANA y 5 mg/l de BAP, luego de transcurrido mes y medio, a partir de callo formado en porciones de hoja y tallo. También se desarrollaron plántulas a partir de callo formado en la base de las hojas en medio WPM conteniendo 1 mg/l de BAP y 0.07 mg/l de ANA.

Se cumplió con el objetivo de contribuir a la conservación de la especie endémica *Hoffmania sessilifolia* L habiendo logrado propagarla por ápices, microestacas y por organogénesis indirecta y directa.

## **INTRODUCCIÓN**

La especie *Hoffmania sessilifolia* L. es una de las 1171 especies endémicas del país y únicamente se encuentra reportada para el departamento de Baja Verapaz (Sierra de las Minas, cerca de Puralhá). La mayoría de las especies endémicas (70%), se encuentran ubicadas en áreas de montaña; actualmente son pocas las áreas que permanecen boscosas en el país.

La política de creación de áreas protegidas, por sí sola no resuelve el problema de la pérdida acelerada de recursos naturales en el ámbito mundial. Se hace necesario crear alternativas de conservación; algunas de ellas son la conservación *ex situ*, conservación *in vitro* de especies y bancos de germoplasma.

Una de las técnicas más eficientes de propagación clonal de plantas es el cultivo de tejidos vegetales, el cual consiste en cultivar diferentes porciones de una planta en un medio nutritivo artificial, bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. Bajo los postulados de la totipotencia celular, en donde toda célula vegetal posee la información genética para regenerar plantas completas, los tejidos así cultivados pueden ser multiplicados en forma masiva. Las principales ventajas de estas novedosas técnicas se centran en la obtención de plántulas libres de patógenos y fieles a la identidad de la planta madre.

Con esta investigación se pretendía encontrar los medios de cultivo más adecuados para la propagación de la especie *Hoffmania sessilifolia* L. como una forma de conservación *ex situ* que en el futuro pueda dar inicio a la formación de un banco de germoplasma de especies endémicas y en peligro de extinción en el país.

### **III DEFINICIÓN DEL PROBLEMA**

Guatemala es un país que posee gran diversidad biológica producto de su ubicación geográfica, fisiografía, clima, suelo e historia geológica y una gran cantidad de plantas del país son endémicas encontrándose en peligro de extinción por la presión que sufren actualmente todos los recursos naturales, con el avance de la frontera agrícola y la deforestación de las zonas boscosas.

Siendo parte del patrimonio natural y cultural, las plantas endémicas poseen gran importancia ecológica para el país, por lo que se deben crear alternativas viables de conservación *ex situ* para evitar la pérdida de tales especies y posteriormente llevar a cabo la repoblación en lugares adecuados.

Con esta investigación se pretende contribuir a la conservación de una de las especies endémicas de Guatemala buscando el medio más adecuado para el desarrollo de brotes a partir de estacas y ápices, y el desarrollo de plántulas a partir de porciones de hoja.

## IV OBJETIVOS

### IV.1 OBJETIVO GENERAL

- Contribuir a la conservación de una especie endémica de Guatemala.

### IV.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer el método de desinfección más aceptable en la obtención de explantes sin contaminación.
- Determinar el medio de cultivo más adecuado para el desarrollo de ápices y microestacas de la especie endémica *Hoffmania sessilifolia* L.
- Estudiar la influencia de cuatro diferentes concentraciones de BAP (bencil aminopurina) sobre el desarrollo de microestacas de *Hoffmania sessilifolia* L.
- Estudiar la influencia de dos diferentes concentraciones de 2,4 D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y 2iP (6-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallylamino)purina) sobre el desarrollo de callo a partir de porciones de hoja de *Hoffmania sessilifolia* L.
- Determinar el medio de cultivo más adecuado para el desarrollo de plántulas de *Hoffmania sessilifolia* L. a partir de segmentos de hoja y de callo.
- Establecer las condiciones más adecuadas para la aclimatación de plántulas obtenidas *in vitro*.

## V. ANTECEDENTES

### 1 Descripción Botánica de la Especie *Hoffmania sessilifolia* L

Habita en el Bosque nuboso a 1600 msnm, en Baja Verapaz (Sierra de las Minas, tipo colectado cerca de Purulhá). (Figura 1).

Arbusto glabro de tres metros de alto, delgado, erecto, esparcidamente ramoso. Las ramas delgadas, cilíndricas, con costillas longitudinales inconspicuas, los internudos al madurar de 6-10 cm de largo; hojas opuestas, iguales, bastante grandes, sésiles y obtusas a subauriculadas o subcordadas en la base, oblanceoladas u oblongo-lanceoladas, acuminadas, de 5-16 cm de largo y 2-5.5 cm de ancho, verdes en el haz, púrpuras brillante en el envés, pero aparentemente se tornan verdes con la edad; inflorescencia corta, cimas axilares de pocas flores, pedúnculo de 0.2-1 cm de largo, flores matizadas con rojo; cáliz e hipantio 5-6 mm de largo, el hipantio de 2-3 mm de largo, glabro, ocho crestas, el cáliz dividido en la base, lóbulos linear-oblongos agudos, 2.5-3 mm de largo, esparcidamente pubescentes o ciliados con pelos segmentados, con glándulas diminutas o apéndices similares a pelos en los senos; corola de cuatro lóbulos, lóbulos lanceolados o lanceoblongos, agudos, 6-7 mm de largo, esparcidamente pubescentes, dorsalmente con pelos largos segmentados, tubo 3-4 mm de largo, estambres achatados abajo del cuello de la corola, 4-4.5 mm de largo, estilo de 9-10 mm de largo, estigma alargado y bilobulado, fruto no conocido.



Fácilmente distinguible de otras especies en América Central y México por sus hojas sésiles, usualmente obtusas y auriculadas o subcordadas a la base, y tallos no alados. Muy cercana a *H. ghiesbreghtii* (22).

## 2 Usos

Para la planta *Hoffmania sessilifolia* L. no está reportado ningún uso, sin embargo, tres plantas de la familia Rubiaceae se utilizan como medicinales por las comunidades de la Reserva de Biosfera Sierra de las Minas, siendo ellas (16): *Richardia scabra*, conocida como hierba buena de monte, es utilizada para curar ganglios inflamados en la región inguinal, dolor de estómago y fiebre; *Coccocypselum cordifolium* es usada para curar verrugas y *Coffea arabica* L. de la cuál utilizan las semillas frescas como oxicítica para facilitar el parto, está comprobado que facilita la orina y alivia el estreñimiento.

Otras plantas de la familia Rubiaceae reportadas como medicinales son:

*Borreria laevis* (Lam.)Griseb. Es utilizada para aliviar el dolor de muelas con caries. Se utilizan de 10 a 20 hojas que se hierven con medio litro de agua y se hacen enjuagues bucales.

*Borreria latifolia* (Aubl)Schum in Mart., Coc pim. Sirve para el tratamiento del hormigueo del cuerpo o la mala circulación sanguínea. Se utilizan las hojas. Se usa conjuntamente con *Desmodium adscendens* (Swartz)DC.; se hierva un manojo de cada planta en dos litros de agua, y se toma la infusión.

*Cephaelis tomentosa* (Aubl)Vahl., Tzo´xul. Es utilizada para tratar los ataques debido a la tensión nerviosa.

*Hamelia rovirosae* Wernham, Journ. Para el tratamiento de la hepatitis, se utilizan las hojas, se hierva un manojo en tres litros de agua. Se utiliza en forma externa por medio de un baño o vía oral por infusión. (18)

*Hoffmannia bullata* L. Es utilizada para tratar hongos de la piel.

*Hoffmannia ghiesbreghtii* (Lem.) Hemsl., Rahil jolom, ixqi q´een. Utilizada para aliviar el dolor de espalda y el cansancio, para aliviar el dolor de cabeza, tratar el adormecimiento e inflamación de los pies, también para tratar el paludismo y el vómito de sangre.

*Manettia reclinata* L, caamay. Se utiliza para curar la diarrea, vómitos y el tratamiento de hongos en la piel. Se utilizan las hojas, se hierva un manojo en tres litros de agua. Se usa externamente, mediante lavados y vía oral por infusiones.

*Psychotria pubescens* Swartz, Zac-ixcanan, guayabeño, se utiliza para el tratamiento del dolor de cabeza y el hormigueo de cuerpo. También es utilizada

para el tratamiento del exceso de menstruación y para bajar la fiebre. Se prepara hirviendo un manojo en medio litro o un litro de agua. Su uso es externo (baño o lienzos) y vía oral (infusión)(18).

### **3 Endemismo**

El endemismo se refiere a la distribución o localización del hábitat de una especie; así, plantas endémicas regionales son aquellas que se encuentran distribuidas únicamente en Centroamérica y México. Plantas endémicas nacionales son las que se localizan exclusivamente dentro del territorio nacional y las plantas endémicas subnacionales son las que se encuentran únicamente en alguna región restringida del país (23). La especie *Hoffmania sessilifolia* L. es una planta endémica subnacional, reportada únicamente en el departamento de Baja Verapaz (22).

### **4 Estudios Realizados**

Estudios sobre micropropagación en la especie *Hoffmania sessilifolia* L. no se han realizado anteriormente, sin embargo, sí existen muchos trabajos realizados en la propagación del café (*Coffea arabica*), especie comercial que pertenece a la misma familia Rubiaceae.

El cultivo de tejidos en café fue reportado primero por Staritski (1970), quién describió la presencia de embriones somáticos a partir de vástagos ortotrópicos de *C. canephora*. Herman y Hass (1975) reportaron el desarrollo de organoides a partir del cultivo de callos (2).

Utilizando segmentos de hojas, Herman y Haas (1975) luego Sondahl y Sharp definieron dos tipos de embriogénesis somática. LFSE (Low Frequency Somatic Embriogenesis) o embriogénesis somática directa de baja frecuencia. El embrión proviene de una única célula inducida (tasa de multiplicación baja). HFSE (High Frequency Somatic Embriogenesis) o embriogénesis somática indirecta de alta frecuencia que produce un callo secundario proveniente de la propagación del callo inicial o primario. Las células embriogénicas provienen de la multiplicación de células inducidas del callo secundario (tasa de multiplicación alta) (9).

Las embriogénesis somática de alta y baja frecuencia a partir de explantes de hojas de café fueron reportadas por primera vez por Sondahl y Sharp (1977) en *C. arabica* var *bourbon* donde dos medios sucesivos fueron necesarios: el medio condicionante y el inductor. Se ha encontrado que la inducción exitosa de callos embriogénicos de alta frecuencia es dependiente del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y de la kinetina. Rangaswamy (1986) considera que la formación de embriones somáticos parece ser el resultado de una interacción muy estrecha entre diversos factores, de los cuales se puede citar el genotipo, la composición del medio y las condiciones del cultivo (2).

Custers (1980) fue el primero en intentar la multiplicación vegetativa a partir de fragmentos de callos ortotrópicos y plagiotrópicos, provistos de yemas preexistentes de *C. arabica*; a su vez, provenientes de semilla sexual. Con trabajos posteriores, Sondahl y Nakamura (1980, 1981, 1982) realizaron cultivos de nudos de *C. arabica*, *C. canephora* X *C. eugenioides* y *C. congensis* X *C. eugenioides*.

Dublin (1980), desarrolló una técnica de multiplicación por microestacas aplicado a *C. canephora* y *C. arabica* y a los híbridos interespecíficos entre ambos (*arabusta*) (8).

Sondahl, en 1977, estudió la **Inducción de alta frecuencia de embriones somáticos en explantes de hoja cultivada de *Coffea arabica* L.** Una alta frecuencia de embriones somáticos HFSE fue observada en experimentos donde cultivos primarios crecieron en "medio condicionante" conteniendo un medio basal (bm), 3% de sacarosa, y varias concentraciones de 2,4-D y kinetina por 7 semanas; y subcultivos en medio condicionante de la misma formulación con una reducción en la concentración de sales BM (X/2) por cuatro semanas. Después, los tejidos fueron subcultivados en un medio de inducción, consistente de X/2 de sales inorgánicas y una concentración incrementada de KNO<sub>3</sub> (2X), BM orgánicos, y kinetina y ANA (ácido naftalenacético) a una relación de concentración de 2.3/0.27 microM, las relaciones de concentración micromolar de kinetina y 2,4-D a 18.4/18.0 y 36.8/4.5 microM en condiciones de medio usados por tejidos durante el cultivo primario y secundario dieron como resultado una óptima producción (HFSE) los cuales son subcultivados en un "medio de inducción". Una baja frecuencia de desarrollo de embriones somáticos (LFSE) fue observada en tejidos cultivados en el medio de inducción derivado de cultivos inicialmente crecidos en condiciones de medio conteniendo ANA y kinetina o ANA y kinetina suplementada con factores de crecimiento indefinido (líquido de endospermo de coco, caseína hidrolizada, extracto de levadura y extractos de hojas de tabaco) (20).

En América Latina, donde es indispensable encontrar una solución genética al problema de la roya, el objetivo es transferir a *C. arabica* los genes de resistencia a la roya de *C. canephora* y crear híbridos estables; sus exigencias ecológicas y sus características agronómicas serán idénticas a las de *C. arabica* y serán capaces de reproducirse fielmente mediante semillas.

Teniendo en cuenta estas perspectivas, desde hace algunos años el CATIE, en Costa Rica, realizó el proyecto de **Micropropagación masal de híbridos F1 de *Coffea arabica* por embriogénesis somática en apoyo al programa regional de mejoramiento (1995-2000)**; en el desarrollaron una metodología de micropropagación masiva (por embriogénesis somática) a bajo costo con relación a la producción de semilla tradicional. Para ello mejoraron las etapas de regeneración y de germinación de los embriones y validaron el sistema de propagación masal. Desarrollaron una metodología de aclimatación a gran escala y difundieron vitroplantas de híbridos en cinco países de la región (6).

Albarran, en 1999, en CATIE, Costa Rica, determinó la ***Influencia de los factores químicos y físicos sobre la regeneración de embriones somáticos de Coffea arabica en biorreactor simplificado***. El objetivo fue optimizar la etapa correspondiente a la regeneración de embriones somáticos, estudiando el efecto de los factores químicos y factores físicos sobre la producción y calidad de los embriones somáticos; así como el efecto que tienen estos factores físicos sobre la nutrición mineral. De los resultados obtenidos encontró que las sales minerales del medio de cultivo Yasuda usando concentraciones de BAP entre 4 y 6 mg/l, son las mejores en términos de mayor producción y calidad de embriones en estado de torpedo, además, mostraron una alta tasa de conversión en planta. En cuanto a las inmersiones se demostró que frecuencias altas y de corta duración diaria, son las más favorables en el proceso de regeneración, mientras que altas o bajas frecuencias pero con excesiva duración de las inmersiones por día, provocan problemas de vitrificación de los embriones disminuyendo su calidad. Un cambio del medio de cultivo con mucha frecuencia provoca un estrés en el tejido vegetal y cambios poco frecuentes, un déficit nutricional que afectan la biomasa total y cantidad de embriones, pero no su calidad. Un cambio de medio de seis semanas, es el recomendado para permitir un buen crecimiento de agregados embriogénicos durante la expresión embriogénica y posterior desarrollo óptimo de los embriones. De los elementos minerales estudiados, el P y el N son los más consumidos por el tejido vegetal durante las primeras semanas de la regeneración, convirtiéndose en factor limitante para la producción de embriones después de seis semanas de cultivo (2).

## **5 Principios Generales**

El cultivo de tejidos *in vitro* comprende en su amplia acepción un heterogeneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplastos, células, tejidos u órganos), se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba bajo condiciones ambientales controladas. Dentro de esta amplia acepción se consideran las siguientes características comunes en el establecimiento de los cultivos *in vitro*:

- Explante
- Normas de asepsia
- Medios de cultivo
- Condiciones ambientales de incubación

La interacción de estos factores determinará el tipo de respuestas, positivas o negativas, que se puedan obtener del cultivo *in vitro*.

### **5.1 El explante**

El explante se puede definir como una porción separada de un vegetal, esta porción puede ser tan pequeña (5-100 $\mu$ ), que sólo contenga algunos protoplastos o células, o puede ser un poco más grande (1-10 mm), abarcando una porción de tejido u órgano.

Cualquier explante que contenga células nucleadas vivas, se pueden emplear potencialmente, para la obtención directa de plantas o para la obtención indirecta de grupos celulares amorfos (al que comúnmente se le denomina callo). Es muy frecuente la utilización de ápices o meristemas caulinares, hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de frutos.

El tipo de explante se seleccionará por razones prácticas como: disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad, baja contaminación con microorganismos y rápida respuesta al cultivo *in vitro*. En estos casos es probable que se opte por explantes provenientes de plantas jóvenes que crecen en invernaderos y una alternativa interesante, sería usar los explantes provenientes de semillas germinadas en condiciones asépticas. La elección de un explante apropiado se complica, si se pretende la regeneración de plantas completas a partir de callos, debido al tiempo que requerirá encontrar las hormonas que produzcan embriones y/o plántulas a partir del callo obtenido.

El tamaño del explante es otro aspecto que debe tenerse en cuenta para el establecimiento de los cultivos *in vitro*; cuanto más grande sea, mayores son las posibilidades de obtener proliferación celular, aunque ello trae consigo mayores posibilidades de heterogeneidad y de contaminación con patógenos.

Existe un tamaño mínimo del explante, que varía según el material vegetal, por debajo del cual no se obtiene proliferación celular u otras respuestas deseables. El cultivo de explantes muy pequeños requiere el empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados. Puede presentarse un dilema: a medida que se aumenta el tamaño del explante se disminuye la posibilidad de lograr el objetivo de libertad viral y a medida que se disminuye el tamaño, la posibilidad de establecer el cultivo y alcanzar la morfogénesis es menor.

En cuanto a la fuente del explante, o sea la planta donante o tejido que se extrae de ella para ser cultivado, debe tenerse en cuenta que no todas las células de los tejidos retienen su totipotencia. En la práctica los tejidos con esta habilidad pueden ser limitados. Muchos tejidos pueden presentar capacidad embriogénica, pero no retener su capacidad organogénica.

La edad, tanto de la planta donante como del explante mismo, es un factor que siempre debe tenerse en cuenta. Los mismos tejidos más jóvenes y menos diferenciados son en general los del mayor éxito en cultivo de tejidos. (15)

En relación con la especie vegetal utilizada, es importante tener en cuenta la variabilidad asociada con el genotipo de las plantas. Es muy frecuente que en condiciones idénticas de medio de cultivo y ambiente, las respuestas *in vitro* de un explante determinado de una especie, difieran de acuerdo al cultivar empleado. Las respuestas de los explantes cultivados *in vitro* pueden variar notablemente, con el estado de desarrollo y edad ontogénica de los mismos. Se debe tener en

cuenta la incidencia de otros factores, que a menudo pueden alterar las respuestas de los explantes cultivados, entre estos factores están: la época del año en que se realizan los cultivos, las condiciones de crecimiento de las plantas donantes y los pretratamientos que se realizan a los explantes.

## **5.2 La Asepsia**

La asociación explante, medio de cultivo artificial y las condiciones ambientales en que normalmente se incuban los cultivos, conforma un ambiente propicio para la proliferación de patógenos (bacterias y hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por los nutrientes del medio de cultivo o modificarlo con toxinas. Evitar las contaminaciones con patógenos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta, para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos, sino en su posterior incubación y manipulación.

Para establecer cultivos *in vitro* que sean asépticos, es conveniente tomar en cuenta lo siguiente:

- Trabajar en ambientes adecuados
- Esterilizar los medios de cultivo
- Desinfectar superficialmente los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos
- Realizar las disecciones y transferencias en ambientes controlados estériles

Hay una vasta gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, pero en la actualidad es casi generalizado el empleo de etanol (70% v/v) y de hipoclorito de sodio (1-3% v/v). Con menor frecuencia se usa el hipoclorito de calcio y el cloruro de mercurio, este último compuesto es altamente tóxico y no puede removerse fácilmente del explante. Durante la desinfección es común adicionar a las soluciones de los productos usados, algún producto surfactante que permita una mayor penetración debida a la disminución de la tensión superficial. Las concentraciones del surfactante son generalmente bajas (0.1% - 1%) y en ocasiones se trata de adicionar unas pocas gotas a la solución (4), el Tween-20 es el más utilizado; aunque puede ser innecesario en los procedimientos de desinfección que incluyen un primer paso con etanol. Es conveniente agitar el explante conjuntamente con la solución desinfectante (80 a 150 rpm).

Después de tratar el explante con las soluciones desinfectantes, es necesario remover de él los restos del producto, mediante varios lavados con agua destilada estéril y operando en la cámara de transferencia. Es aconsejable lavar los explantes con agua estéril y con un volumen por lo menos de 10 a 20 veces mayor del volumen del explante, haciendo un mínimo de tres enjuagues sucesivos. El procedimiento para la desinfección superficial de los explantes debe permitir eliminar los patógenos y causar el menor daño posible, para los explantes. (12)

Por asepsia en el establecimiento y posterior manipulación de los cultivos es preciso adoptar algunas precauciones durante las tareas que se llevan a cabo en la cámara de transferencia, como:

- Antes de comenzar a trabajar, desinfectar la mesa y las paredes de la cámara de transferencia con etanol al 70%; igualmente es conveniente desinfectar la parte externa de los recipientes que contienen los medios de cultivo o el agua estéril antes de introducirlos a la cámara de transferencia.
- Es necesario que las manos y, eventualmente, los antebrazos del operador, sean desinfectados con etanol al 70%; el uso de mascarillas no es imprescindible, pero reduce la contaminación si se opera en flujos laminares de aire estéril.
- Los instrumentos metálicos empleados se deben flamear previamente con etanol al 95%; el material de vidrio utilizado como soporte para las disecciones (cajas de petri) debe estar esterilizado.
- Realizar las operaciones de transferencia y disección lo más cerca posible a la llama de un mechero, evitando exposiciones prolongadas de los explantes o de los medios de cultivo en recipientes abiertos. (12)

Algunos medios pueden incluir sustancias inestables a altas temperaturas (antibióticos, giberilinas, algunas vitaminas, zeatinas, etc.), que por tal razón no deben ser sometidas al proceso de autoclavado. En este caso se aconseja la esterilización del medio en autoclave y los productos termolábiles deben ser esterilizados por medio de filtración.

En lo relacionado con áreas de transferencia debe tenerse el mayor cuidado posible para lograr la asepsia. Deben, pues, tomarse precauciones que eviten la contaminación de los medios, de los explantes, por lo tanto la transferencia debe realizarse siempre bajo condiciones asépticas. Aunque anteriormente los cuartos de transferencia eran esterilizados por medio de luz ultravioleta, lo cual obligaba a tomar serias precauciones para evitar accidentes; en la actualidad la mayoría de los laboratorios cuenta con cámara de flujo laminar. Este tipo de cámara consta de prefiltros y filtros por donde se hace pasar el aire y que al llegar al área de trabajo proporciona un flujo de aire aséptico. Algunas cámaras de flujo laminar tienen incorporadas lámparas de luz ultravioleta, las cuales se encienden cuando no se está utilizando la cámara. En estos casos debe tenerse cuidado de apagarlas antes de iniciar el trabajo en cámara.

Es importante en las cámaras de flujo laminar renovar los filtros y prefiltros con una determinada periodicidad, lo cual depende del tipo de aire que debe ser filtrado, el tiempo durante el cual se utiliza la cámara, la asepsia general del laboratorio, etc. Para la constatación de la asepsia de la cámara se acostumbra colocar cajas de Petri con PDA y dejarlas dentro de la cámara sin tapa durante unos 5-10 minutos, luego tapanlas nuevamente y proceder a la incubación. Si la cámara es eficiente en la filtración, no deben presentarse colonias de hongos en las cajas Petri.

Finalmente es bueno mencionar que las cámaras de flujo laminar pueden ser de flujo vertical u horizontal. Este último tipo es el más utilizado; existen diversas empresas que están en capacidad de producirlas a precios relativamente razonables.

El trabajo de cultivo de tejidos puede realizarse en cámaras más rústicas, utilizando una buena cantidad de mecheros que consuman alcohol y se han diseñado, además, algunos tipos de cámaras portátiles pequeñas que pueden ser llevadas al campo para recolección de materiales.

Sin embargo, el trabajo en cámara siempre está acompañado del uso de mecheros, con el fin de realizar constantes flameos de las herramientas cada vez que se realice un corte, o después de suspender el trabajo por alguna razón. En la actualidad el uso de bactoincineradores, puede reemplazar el uso de mecheros para flameo de herramientas.

Finalmente es de gran importancia la asepsia de los operarios de los laboratorios. Antes de iniciar labores los operarios deben lavarse sus manos y utilizar vestuario limpio, con el fin de evitar contaminar los cultivos con patógenos que normalmente se adhieren a la ropa. De forma similar antes de iniciar labores en la cámara de flujo laminar debe hacerse una aspersión a brazos y manos con alcohol al 70% (15).

### **5.3 Los Medios de Cultivo**

Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo *in vitro*, de un determinado explante, es necesario elegir un medio apropiado de cultivo, en el cual hay que considerar no sólo sus componentes sino su preparación. (12)

Es uno de los factores más determinantes del éxito y aunque el medio Murashige y Skoog es el más utilizado, existen respuestas diferentes de las plantas a cada medio específico, lo cual manifiesta los requisitos particulares de nutrición y hormonas de una determinada planta.

Estos deben tener presentes todos los elementos esenciales para el crecimiento de plantas, fuente de carbono, auxinas, giberelina y citokininas, vitaminas y algunos adicionan al medio compuestos orgánicos y en ocasiones carbón activado, antibióticos, osmorreguladores, etc.

El estado físico del medio de cultivo tiene también su participación en el éxito. Tanto células, tejidos, órganos y embriones, cuando se cultivan en suspensión tienen ventajas en la manipulación y están expuestos más directamente al medio nutritivo. Sin embargo, cada cultivo puede presentar respuestas diferentes al estado físico del medio. En experimentos con *Brassica napus* y *B. oleracea* se ha encontrado un mayor crecimiento de brotes en medio gelificado que en medio

líquido. El pH del medio es también determinante y en la mayoría de los casos el pH va desde 5.6 hasta 5.8. (15)

### **5.3.1 Componentes del Medio de Cultivo**

En la actualidad existen innumerables formulaciones, cada una de las cuales contienen entre 15 y 32 compuestos químicos que suministran: carbono, nutrientes minerales, vitaminas, sustancias reguladoras del crecimiento, compuestos orgánicos naturales y agentes gelificantes (en el caso de los medios semisólidos).

#### **Fuentes de Carbono**

Pocos explantes son autótrofos y, por lo tanto, es necesario agregar al medio una fuente de carbono; la sacarosa (2-5%) es el azúcar que más utilizan, y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructosa. La incorporación de myo-inositol al medio de cultivo (100 mg/l), da como resultado un mejor crecimiento celular.

#### **Nutrientes Minerales**

Los explantes propagados *in vitro* requieren una fuente continua de compuestos inorgánicos. Los minerales a utilizar se pueden dividir en dos grupos: macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S) y micronutrientes (Fe, Mn, Zn, Bo, Cu, Co y Mo).

**Macronutrientes:** dentro de los macronutrientes se encuentran el nitrógeno, el fósforo, el potasio, el calcio, el magnesio y el azufre. El nitrógeno es de extraordinaria importancia en las plantas porque es un constituyente de proteínas, ácidos nucleicos y muchas otras sustancias importantes. El fósforo es parte estructural de ácidos nucleicos, fosfolípidos y otros compuestos. El potasio se enlaza iónicamente al piruvato quinasa, que es esencial en la respiración y el metabolismo de los carbohidratos. El calcio es importante en la síntesis de pectina de la lámina media de la pared celular y en el metabolismo y formación del núcleo y mitocondrias. El magnesio es un activador de muchas reacciones de transferencia de fosfatos y enzimas, participa en las síntesis que se realizan en el núcleo, cloroplastos y ribosomas. El azufre forma parte de los aminoácidos, es importante constituyente de las proteínas y de algunos compuestos de actividad biológica.

**Micronutrientes:** entre los micronutrientes que la planta necesita están el hierro, el manganeso, el cobre, el zinc, el molibdeno, el cobalto y el boro. Para una adecuada actividad metabólica, las células vegetales requieren de hierro para la formación de precursores de la clorofila. El manganeso es necesario para el mantenimiento de la ultraestructura y proceso fotosintético. El cobre y zinc son requeridos para la oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos.

El molibdeno y el hierro forman parte de las enzimas nitrato reductasa y nitrogenasa. El cobalto es el componente de la vitamina B<sub>12</sub>; el boro es necesario

para el mantenimiento de la actividad meristemática. Varios micronutrientes están relacionados con la actividad de los reguladores del crecimiento.

### **Vitaminas**

Las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo vegetal y son requeridas en pequeñas cantidades. Las vitaminas más empleadas son: vitamina B<sub>1</sub> en forma de tiamina-HCl, vitamina B<sub>6</sub> en forma de piridoxina-HCl, vitamina E, ácido nicotínico, ácido pantoténico, ácido fólico, riboflavina y myo-inositol.

### **Reguladores del Crecimiento**

En el cultivo de tejidos se utilizan cuatro grupos:

**Auxinas:** ayudan a la elongación de las células, entre las que tenemos ácido indolbutírico (AIB), ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido paraclorofenoxiacético (PCA). (15)

Las auxinas tienen la capacidad de incrementar el índice de prolongación de las células de los coleótilos y tallos. Influyen también en otros procesos fisiológicos, como son el desarrollo de frutos y la formación de raíces. Una concentración baja de auxinas estimula la prolongación de las células; sin embargo, una concentración extremadamente alta puede provocar inhibiciones. No obstante, la cantidad de auxinas obtenidas de extractos de plantas, no es por lo general lo bastante grande para provocar la inhibición.

Los compuestos que tienen actividad auxínica son orgánicos; todos ellos poseen hidrógeno y oxígeno en proporciones y disposiciones diferentes y algunos de ellos contienen, además, nitrógeno y cloro; algunos tienen estructuras simples, pero la mayoría son complejos. El AIA, una de las principales auxinas que aparecen en las plantas superiores, se detectó en una gran variedad de tejidos vegetales. Por lo común, el nivel de AIA en tejidos de plantas varía según la etapa de desarrollo del vegetal. Por ejemplo, se ha encontrado la hormona en las hojas internas e incoloras de las coles de Bruselas; pero no en las hojas verdes exteriores. El AIAld es una sustancia neutra que se encuentra en tejidos vegetales y que puede transformarse rápidamente en AIA en el suelo o por medio de preparados de dehidrogenasa aldehídica. Los pequeños efectos auxínicos producidos por el AIAld, quizá se deban a su transformación en AIA en tejidos vegetales.

Además de las sustancias que pueden identificarse con mayor o menor certeza mediante compuestos indólicos conocidos, existen otros tipos de auxina que aún no se identifican, incluyendo las auxinas solubles en agua. No existen auxinas en los tejidos vegetales, las hay tan solo como moléculas libres de AIA. Se les encuentra enlazadas o formando complejos; por ejemplo, el AIA puede estar conjugado con un azúcar o un aminoácido. Puede haber precursores neutros que no estén inmediatamente disponibles para el crecimiento, pero que pueden transformarse en AIA. Se han encontrado complejos precursores, principalmente en los tejidos de almacenamiento como son los de semillas y tubérculos.

También se ha demostrado la existencia de un complejo de ácido ascórbico, que da origen al AIA, como resultado de la hidrólisis alcalina. Se han formado péptidos indolacetílicos, al añadir AIA a muchos tejidos de plantas, y es posible que se trate de un tipo de auxina enlazada. En varias especies de *Brassica* se encuentran grandes cantidades de glucobrasicina y otros compuestos relacionados, y pueden sufrir una serie de reacciones tanto químicas como enzimáticas, hasta generar numerosos compuestos indólicos. Uno es el ascorbigeno, forma enlazada de ácido ascórbico.

Las auxinas desempeñan la función importante en la expansión de las células de tallos y coleoptilos. Estimulan la división celular; por ejemplo, frecuentemente fomentan el desarrollo de callos, de los que se desprenden crecimientos similares a raíces. Las auxinas son muy efectivas en iniciar la formación de raíces de varias especies vegetales. Pueden iniciar la floración e inducir el amarre de frutos y su desarrollo en algunas especies. Hacen aumentar con frecuencia el amarre de frutos sobre todo en especies con frutos de muchas semillas, como son los pimientos y las cucurbitáceas. La aplicación de auxinas a frutos jóvenes y en desarrollo, aumenta su tamaño. Se adelanta también la maduración de algunos frutos, como los higos.

La aplicación de auxinas realiza con frecuencia la dominancia apical. Las auxinas estimulan también las actividades cambiales y pueden afectar los fenómenos de abscisión y la diferenciación de capas de abscisión; aunque con frecuencia retardan su desarrollo.

***Mecanismo de acción:***

Una de las primeras teorías, es que la auxina incrementa la plasticidad de las paredes celulares, sigue siendo la más satisfactoria, aunque se necesita efectuar más trabajos a fin de revelar cuáles son los mecanismos exactos que se encuentran implicados. Cuando se incrementa la flexibilidad de las paredes, disminuye la presión de ésta alrededor de la célula y la presión de turgencia causada por las fuerzas osmóticas en la savia vacuolar, hace que el agua entre a las células, provocando su expansión.

La plasticidad es una deformación irreversible de las paredes, provocada probablemente por la ruptura de enlaces cruzados entre las microfibrillas de celulosa de las paredes celulares. El aumento del tamaño de las células se produce en dos etapas. Primeramente, ocurre un aflojamiento de las paredes celulares (proceso que requiere la presencia de auxinas y oxígeno), seguido de una absorción de agua y una expansión de las paredes.

Resulta cada vez más evidente que las auxinas, al igual que otras hormonas, pueden actuar controlando el tipo de enzimas producidas en las células. Thimann en 1969 sugirió que las auxinas pueden funcionar mediante la activación de un tipo mensajero de RNA, que provoca la síntesis de enzimas específicas. Dichas enzimas generan la inserción de nuevos materiales en las paredes celulares, lo cual da por resultado la expansión.

Las auxinas provocan y fomentan la síntesis de RNA y proteínas. Esa síntesis puede ser un requisito previo del crecimiento provocado por las auxinas; no obstante, la presencia del retraso de una hora entre la aplicación de las auxinas a secciones de los tallos de chícharo y el aumento de RNA parece no estar de acuerdo con esa teoría. Aunque los efectos de las auxinas en la síntesis de RNA parecen ser cuantitativos y no cualitativos, un RNA mensajero que sea específico del crecimiento provocado por auxinas, puede encontrarse presente en las células: al aplicarse las auxinas, el código del RNA mensajero se traduce en proteínas. Es posible que dos RNA se encuentren presentes en la célula –uno que se active en la célula antes de la aplicación de las auxinas, y otro que se asocie con la respuesta real de crecimiento.

Las auxinas son responsables de promover el crecimiento de tejidos de las plantas por dos vías:

Por inducción de la secreción de iones de hidrógeno dentro y a través de la pared celular. Uniendo auxina a la descomposición de lípidos y acidificación de la pared, incrementando su extensibilidad. Los iones potasio son introducidos dentro de la célula para contrarrestar la exportación de iones H (protones) y esto tiene el efecto de disminuir el potencial de agua dentro de la célula, entonces, el agua entra, y la célula se expande.

Por un efecto sobre el metabolismo del ARN (y por lo tanto en la síntesis de proteínas), posiblemente por inducción de la transcripción de moléculas de mensajeros específicos de ARN (ARNm). Los ARNsm son considerados como codificadores de proteínas que se requieren para un crecimiento sostenido. En cultivos de tabaco, las auxinas parecen estimular la síntesis de enzima  $\beta$ -1,3 glucanasa (24).

Las auxinas parecen ser capaces de borrar la fisiología genética programada del tejido de las plantas completas, el cuál ha sido determinado previamente por estados diferenciados. Las células las cuales responden a la reversión de las auxinas a un estado desdiferenciado, comienzan a dividirse. Cómo las auxinas causan esta reprogramación no está al momento completamente entendido. Lo Schiavo et al (1989) encontró que las auxinas causan que el DNA sea metilado más que lo usual y muestra que esto puede ser necesario para la reprogramación de células diferenciadas. Programas específicos del tejido especialmente asociados con la diferenciación podrían ser erradicados por hipermetilación, sin embargo una pequeña fracción de células enriquecidas en un último estado de la diferenciación, son capaces de morfogénesis o embriogénesis.

Las auxinas sintéticas más comúnmente utilizadas en cultivo de tejidos son: ácido dicloro fenoxiacético (2,4 D), ácido 3-indolbutírico (AIB) y ácido 1-naftalenacético (ANA). Junto con citoquininas el 2,4 D es utilizado primariamente para la inducción de callo y en cultivo de suspensión reemplazándose por ANA e AIB

cuando la morfogénesis es requerida. El ANA e AIB son auxinas utilizadas en la formación de brotes.

***Efectos en cultivo de tejidos:***

***Inducción del crecimiento de callo:***

Una auxina es requerida generalmente para ser incorporada dentro del medio nutriente para la inducción de callo en explantes.

La auxina más frecuentemente empleada para iniciar el cultivo de callo es 2,4 D; pero los cultivos mantenidos en 2,4 D pueden ser responsables de ser genéticamente variables, algunos investigadores prefieren utilizar ANA o AIA o transferir el callo a un medio que contenga una de estas alternativas en lugar de ser inicializado por 2,4 D. Para la inducción de callo en plantas de hoja ancha es utilizado en niveles entre 4.5-13.6  $\mu\text{M}$  (1-3 mg/L).

Para la inducción del crecimiento de callo en explantes de dicotiledóneas una citocinina es siempre agregada al medio en adición a la auxina. En las monocotiledóneas la presencia de citocininas puede no ser necesaria, en estas plantas una alta concentración de auxina, 2,4 D (2-10 mg/L) es usualmente utilizado.

Las auxinas promueven la dispersión celular en cultivos en suspensión mientras que las citocininas tienden a causar agregación celular. Altos niveles de auxina agregados a medio líquido para este propósito previenen morfogénesis, pero pueden inducir embriogénesis si las células son aún competentes.

***Formación de clorofila:***

Mientras las citocininas tienden a promover la formación de clorofila en callos y cultivos en suspensiones, las auxinas pueden ser inhibitorias. Un nivel reducido de auxina retrasa la aparición de clorofila.

***Morfogénesis:***

***Formación de brotes y raíces:***

La formación de tallo y raíz en cultivos de callo usualmente requiere ajustar los niveles de auxina y citocinina que son necesarios para la iniciación celular y crecimiento.

Una alta concentración de citocinina es requerida para la inducción directa de brotes en explantes. En contraste, la rizogénesis se produce en tratamiento con auxina, o con mezclas conteniendo una concentración más alta de auxina que de citocinina, las citocininas exógenas son comúnmente inhibidas. La auxina induce la formación de raíces o induce la síntesis de poliaminas.

***Embriogénesis:***

El proceso de embriogénesis somática es a menudo iniciado en medio conteniendo altos niveles de auxina (especialmente 2,4 D), pero los embriones no se desarrollan hasta que la concentración de auxina es reducida. Sharp et al

(1980) propuso que la auxina induce una determinación embriogénica en una proporción de células en callo o cultivos en suspensión pero al mismo tiempo causan que estas células inducidas cesen la división.

La división de células proembriogénicas esta disminuída, en bajas concentraciones de auxinas. Existen sin embargo, muchas excepciones a esta observación general, donde los embriones somáticos han aparecido en medios de cultivo debido a presencia de auxinas. Es posible que la embriogénesis ha sido inducida por una auxina endógena, la concentración de la cuál ha sido reducida por el metabolismo o la unión permitiendo la formación de embriones.

El descubrimiento de que la formación de embriones en zanahoria puede ser regulado por el pH, hace posible que al menos algunos de los efectos de las auxinas sobre la formación y mantenimiento de los cultivos embriogénicos puede ser atribuído a su capacidad para reducir el pH intracelular.

La formación de embriones coincide con la concentración de auxina y un aumento en el pH celular. Sin embargo, la embriogénesis somática en zanahoria es inducida por un exceso de iones hipoclorito, exponiendo los tejidos a un alto potencial osmótico (0.7 mM sucrosa o 0.6 M manitol); o 0.3 M de NaCl y por exposición a iones metálicos pesados, especialmente 0.5-1 mM  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$  y  $\text{Co}^{+2}$ . Así puede ser asumido que el pH es solamente un factor que controla, un mecanismo común fisiológico por el cuál diferentes estímulos pueden inducir la embriogénesis.

En la inducción de embriogénesis somática de cotiledones inmaduros de *Glycine max*, Lazzeri et al (1988) descubrieron una interacción altamente significativa entre la concentración de auxina y sucrosa en el medio. El número de embriones obtenidos era reducido si había una alta concentración de auxina o sucrosa combinada con una baja concentración de otra; había una alta frecuencia de formación de embriones somáticos con 1-2% de sucrosa y 6.25-25 mg/L ANA, o 4% de sucrosa y 50mg/L de ANA.

Ranch et al (1986) previamente utilizó 5 mg/L 2,4D con 6% de sucrosa para obtener embriogénesis máxima, mientras Lippmann y Lippmann (1984) encontró que 1mg/L de 2,4D y 1% de sucrosa era satisfactorio. Sin embargo, ambos directa o indirectamente, el azúcar proporciona sitios a través de los cuales una concentración de auxina efectiva puede ser reducida por conjugación.

### **Cultivo de órganos:**

Una auxina es siempre invariablemente requerida para promover el crecimiento inicial de meristemos y explantes de tallo. Una baja concentración de auxina es a menudo utilizada en conjugación con altos niveles de citocinina cuando la multiplicación del tallo es requerida, así, en algunos casos la citocinina sola es suficiente. Es importante escoger una auxina a una concentración a la cuál promoverá crecimiento sin inducir la formación de callo.

**Regulación de la actividad de auxinas:**

La diferenciación, división y el potencial morfogénico de las células de la planta pueden depender no solamente de las auxinas agregadas al medio de crecimiento, pero también al AIA dentro del cultivo de tejidos y la interacción entre los dos. Los factores que afectan los niveles naturales de AIA y la actividad de este compuesto, pueden ser importantes en el control del crecimiento y la morfogénesis en el cultivo de tejidos en plantas utilizadas para micropropagación.

La acción de la auxina depende de la disponibilidad libre de boro. En plantas deficientes en boro, ambos la traslocación de AIA y la síntesis nuclear de RNA en respuesta al tratamiento con auxina han sido inhibidas.

Este resultado es una pérdida de respuesta a auxinas en la ausencia de boro, por ejemplo la promoción de raíces por IBA.

La regulación del nivel de auxina AIA puede lograrse naturalmente dentro de las células de la planta por variación en el rango de su biosíntesis o metabolismo, o en el grado de su desactivación. El AIA es desactivado al ser oxidado y descompuesto en otros compuestos, o unido a otras moléculas.

El AIA es lábil al calor, por lo cuál es esterilizado por filtración antes de la adición al medio, no es generalmente un regulador exógeno muy efectivo para promover el crecimiento o morfogénesis, probablemente porque es más rápidamente metabolizado.

**Sítios de unión:****Receptores de auxinas:**

Para la regulación de al menos algunos procesos involucrados en el crecimiento de las células y en la división celular, las auxinas necesitan estar unidas a una o más proteínas, denominadas receptores, las cuales están involucrados en la acción fisiológica de las auxinas. Un receptor puede estar situado en la membrana celular, otro dentro de la célula, capaz de ciclos entre citoplasma y núcleo.

**AIA Conjugado:**

Una proporción del AIA producido dentro de la mayoría de las plantas reacciona con otros compuestos para producir estéres, amidas o glucósidos. Parece ser un mecanismo para almacenar AIA en las células, estableciendo el nivel de auxinas libres en la planta, y metabolizando el exceso. La auxina en las moléculas conjugadas es protegida del rompimiento oxidativo y puede ser liberada iniciando la acción de enzimas cuando es requerida:

AIA + alcohol  $\Leftrightarrow$  AIA ester

AIA + aminoácido  $\Leftrightarrow$  AIA amida

La proporción de AIA conjugada puede diferir significativamente entre diferentes genotipos relacionados y la naturaleza de los complejos formados varían en diferentes géneros de plantas.

**Citocininas:** promueven la división celular y la producción de callos. Las más utilizadas son: benciladenina (BA), cinetina y zeatina (15).

Son sustancias que provocan la división celular en ciertos vegetales cortados en presencia de las auxinas. Por su actividad se asemejan a la cinetina, primera citocinina descubierta.

Niveles relativamente altos se han hallado en tejidos que presentan una división celular activa, como las semillas en germinación y los frutos jóvenes. Por tal razón las citocininas se consideran reguladores de la división celular.

Sustancias similares a las citocininas se han hallado en microorganismos y extractos de levadura. Por su parte, las citocininas se han encontrado en semillas en germinación, de cebada, lechuga y chícharo. Generalmente las actividades de las citocininas se correlacionan con la ubicación de las regiones de división celular activa y los períodos de división celular activa.

Es probable que las citocininas se sinteticen en las puntas de las raíces y se desplacen por el xilema hacia las hojas, donde desempeñan importantes funciones en el metabolismo y envejecimiento.

La primera citocinina cristalina se extrajo de semillas de *Zea mays* y se le denominó "zeatina". La zeatina, es un compuesto extremadamente activo (aproximadamente diez veces más que la cinetina). Se ha encontrado un compuesto de estructura similar a la de la zeatina, el 2iP, en cultivos de *Corynebacterium fascians*, bacteria que produce un tipo de desarrollo de "crecimiento excesivo" en algunas plantas superiores. Este compuesto se ha aislado también como ribonucleósido de la transferencia de tirosina y serina del RNA de levadura y, asimismo, como hidrolizados solubles de RNA en chícharos, espinacas, levadura y varios tipos de extractos.

Dos efectos sorprendentes de las citocininas son provocar la división celular y regular la diferenciación en los tejidos cortados. Se requiere citocinina tanto en la iniciación como en la continuación de la división celular.

Además de fomentar la división celular, las citocininas influyen en la diferenciación de los cultivos. Interactúan con las auxinas para mostrar expresiones diferentes de crecimiento. Cuando la cantidad de citocininas es baja en proporción con las auxinas, se produce un desarrollo en las raíces; pero cuando es elevada, se desarrollan tanto las yemas como los brotes. Cuando la relación es intermedia, se desarrollan tejidos de callos no diferenciados. Esos resultados sugieren

firmemente que las citocininas pueden resultar importantes en el control de la forma de las plantas, así como en la división celular.

Las citocininas provocan también la elongación de algunas hojas y la elongación de segmentos de tallos etiolados. Retrasan el envejecimiento de los tejidos vegetales. Aparentemente, los efectos antisenescentes de las citocininas se deben al mantenimiento de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos en la oscuridad, cuando se tratan primeramente con cinetina.

En ocasiones afectan la germinación. Las semillas de ciertas variedades de lechuga, cuya germinación requiere luz, pueden germinar en la oscuridad, cuando se les trata con cinetina.

La aplicación de citocininas en las yemas axilares de los manzanos y brotes de albaricoque, permiten vencer la dominancia apical. Las yemas axilares de brotes en crecimiento activo, producen espolones y ramas laterales cuando se tratan con citocininas.

***Mecanismo de acción:***

Se sabe que las citocininas pueden incorporarse a ácidos nucleicos en las células. El hecho de que muchas citocininas se hayan aislado a partir de preparados de RNA, indica que las citocininas están relacionadas de algún modo con los ácidos nucleicos. Pueden actuar como depresores de los genes.

Hay ciertas pruebas de que el RNA de transferencia para el aminoácido serina, la citocinina 6-( $\gamma,\gamma$ -dimetilalilamino)purina es una base impar inmediatamente adyacente al anticodón. También se han detectado citocininas en el RNA de transferencia de serina, en el hígado, las levaduras y el RNA de *Escherichia coli*. Se ha encontrado la misma base junto al anticodón de un RNA de transferencia de tirosina; sin embargo se observó que los preparados de RNA de transferencia de arginina, fenilalanina, glicina, valina y alanina, no presentan ninguna actividad propia de las citocininas (24).

***Actividad Biológica:***

Las citocininas producen efectos menores cuando son aplicadas en plantas intactas, pero se ha observado una estimulación de la síntesis de proteínas. Por esta razón ellas pueden promover la maduración de cloroplastos y postergar la senescencia de hojas desprendidas. La aplicación de citocininas a un único sitio en la planta (hoja) causa que el órgano tratado active el transporte de aminoácidos, el cuál entonces migra al órgano desde los sitios que lo rodean. El efecto de las citocininas es más notable en cultivo de tejidos donde es utilizada conjuntamente con auxinas, estimulan la división celular y controlan la morfogénesis.

Agregada a tallo en medio de cultivo, estos compuestos superan la dominancia apical y liberan retoños laterales en dormancia. En este respecto parecen tener un efecto opuesto al de las auxinas endógenas.

**Citocininas que ocurren naturalmente:**

Al menos 25 citocininas naturales que crecen en las plantas han sido identificadas, están relacionadas estructuralmente a la kinetina, como compuestos libres, así como, glucósidos o ribósidos (kinetina, zeatina, 2iP).

En las plantas, las raíces parecen ser el sitio de biosíntesis de citocininas, pero también existe producción en otros tejidos con división activa, así como el cambium.

Las citocininas producidas en la raíz son transportadas por el xilema a otras regiones de la planta. La citocinina producida en el tallo es una pequeña proporción del formado por los ápices de raíces.

**Modo de acción:**

El modo de acción es incierto. Algunas han sido encontradas en moléculas de ARN de transferencia, pero no es clara la incorporación en el ARN. En algunas circunstancias, las citocininas han mostrado ser activas en la síntesis del ARN, estimulan la síntesis de proteínas y la actividad enzimática.

Otros investigadores han reportado un bajo nivel de incorporación de la citocinina análoga sintética dentro del ARN<sub>t</sub>.

La acción de las citocininas es dependiente de la luz. En azul, rojo lejano y blanco, la proliferación de brotes de *Prunus* por BAP fue fuertemente dependiente del rango de afluencia de protones, pero el rango de afluencia de fuente de luz roja no fue crítica. Baraldi et al (1988) mostró que la proliferación de brotes por citocinina fue promovida por una respuesta a baja energía del fitocromo. En condiciones en las cuales no se induce la proliferación de brotes, la oscuridad o baja influencia del rojo lejano, el BAP inhibe la elongación de brotes.

Las citocininas bloquean la síntesis de un polipéptido (enzima  $\beta$ 1-3-glucanasa) estimulada por una auxina.

Algunas aminopurinas con propiedades de citocinina actúan como reductoras en la reacción fotoquímica con riboflavina y son oxidadas a adenina. Parte de los efectos biológicos producidos por citocininas podrían ser debido a la inhibición de la oxidación de AIA. La cinetina (0.04-1 mg/l) altera la actividad, distribución y composición de isoenzimas oxidasa AIA en las células de callo del tabaco.

El callo inducido para formar brotes por la adición de citocinina fue más compacto que el callo que no formó brotes. Kirkham y Holder investigó el efecto de la cinetina en el potencial de agua en el callo, la citocinina hace las paredes más rígidas, tanto que la turgencia de las células es incrementada. El potencial de agua de las células fue incrementado (haciéndolo menos negativo) no tomando agua del medio que la rodea. Esto fue directamente opuesto al efecto de la auxina p-CPA.

**Metabolismo de carbohidratos:**

Aparte de un posible efecto sobre los niveles de la auxina endógena, la citocinina parece estar implicada en el metabolismo del azúcar; en ambos, descensos e incrementos en la actividad específica de las enzimas de las vías glicolíticas y pentosa fosfato oxidativa. Un medio conteniendo sulfato de adenina en adición a cinetina, conduce la formación de brotes en *Nicotiana tabacum*, causando un marcado incremento en las actividades de dos enzimas de la vía pentosa fosfato oxidativa (glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y 6 fosfogluconato deshidrogenasa), comparado a sus actividades en un medio no formador de brotes.

Las condiciones que favorecen la formación de yemas incluyen la disponibilidad de citocininas, parecen aumentar también el metabolismo del almidón en callo de tabaco. El callo el cuál produce brotes tiene alta actividad específica de enzimas involucradas en ambos procesos; acumulación y rotura de almidón. La citocinina reduce el canal de oxígeno de las células e inhibe la vía alternativa, respiración resistente a cianuro, la cual existe en muchas plantas.

**Efectos en cultivo de tejidos:**

**Estimulación de la división celular:**

En cultivo de tejidos, las citocininas parecen ser necesarias para la división celular. En su ausencia, la metafase pero no la profase de la mitosis, es considerablemente prolongada, y ha sido observado que la citocinina puede ser requerida para regular la síntesis de proteínas involucradas en la formación y función del huso del aparato mitótico. En cultivos donde la citocinina, es limitada, la división del núcleo celular es detenida en un estado del ciclo celular. La subcultura del tejido dentro de un medio conteniendo una citocinina puede causar que las células se dividan sincrónicamente después de un período de descanso. Los tejidos del callo en el cuál la división celular continua sin la adición de citocinina al medio de cultivo, son capaces de producir sus propias sustancias de crecimiento natural.

La proliferación de callo del tejido de la mayoría de plantas dicotiledóneas usualmente requiere la presencia de ambas, auxinas y citocininas en medio de crecimiento, pero Nitsch y Biu Dang Ha (1967) encontrarón que la proliferación de explantes de meristemas de tabaco podría tomar lugar si una citocinina sintética y una auxina eran suplementadas secuencialmente en orden. Así, cuando se siembran por un día en un medio basal conteniendo 0.2 mg/l de cinetina, antes de ser transferidos por 20 días al mismo medio basal pero con 1.8 mg/l de AIA se produce mayor cantidad de callo que cuando la misma cantidad de auxina y citocinina estuvieron disponibles.

En contraste no hubo crecimiento si AIA era proporcionado por un día y la cinetina por el resto del tiempo. La promoción secuencial de crecimiento no fue aparente sin embargo cuando citocininas naturales fueron empleadas. Nitsch (1968) interpretó estos resultados indicando que las citocininas actúan durante la fase de pretratamiento del nivel de DNA (siempre considerando que ocurren divisiones

celulares durante este período) y la citocinina natural fue degradada también rápidamente siendo efectiva, excepto cuando se presentan en el medio continuamente.

**Formación de brotes adventicios:**

Las citocininas son muy efectivas en promover directa o indirectamente la iniciación de brotes. Un balance entre auxina y citocinina normalmente da la más efectiva organogénesis.

**Embriogénesis;**

Una baja concentración de citocinina (típicamente 0.5-2.5  $\mu\text{M}$ ) es a menudo agregada al medio para la inducción de callo embriogénico, especialmente en plantas de hoja ancha. Existe, sin embargo, alguna evidencia que muestra que la citocinina puede inhibir embriogénesis en monocotiledóneas, 0.001 $\mu\text{M}$  de citocinina inhibe en *Dactylis glomerata*.

La presencia de citocinina endógena puede también ser responsable de la incapacidad para obtener embriogénesis en algunos genotipos.

Las secciones de hoja de cadenas no embriogénicas de esta gramínea contienen menos citocinina natural que aquella que fue capaz de producir callo embriogénico.

**Uso en cultivo de brotes:**

**Proliferación axilar de brotes:**

Fomenta el crecimiento de yemas axilares y reduce la dominancia apical en cultivo de brotes de plantas de hoja ancha. Un buen tratamiento induce el crecimiento de muchos pequeños brotes de cada explante en un período de 4-6 semanas. Rangos de citocinina altos, causan la producción de muchos brotes pequeños, en 4-6 semanas, los cuales típicamente no logran elongarse, ellos pueden causar que las hojas de algunas especies tengan una forma inusual e induzcan los brotes a ser hiperhídricos.

**Formación adventicia de yemas y brotes:**

La formación de brotes adventicios, directamente del tejido del explante o indirectamente del callo, es regulado por interacción entre auxinas y citocininas.

**Inhibición de formación de raíz:**

Altas concentraciones de citocinina (0.5-10 mg/L) generalmente inhiben o postergan la formación de raíz y promueven los efectos de las auxinas en la iniciación de la raíz.

A pesar de estas observaciones, existen reportes sobre que las citocininas pueden algunas veces inducir o promover el crecimiento de raíz o formación adventicia de raíz en la ausencia de auxinas.

**Especificidad de acción:**

El efecto de las citocininas en tejidos o cultivo de órganos puede variar de acuerdo al compuesto particularmente utilizado, el tipo de cultivo, la variedad de planta de la cual fue derivado y si el explante es derivado de tejido juvenil o maduro.

En *Corylus avellana* 5mg/L de BAP brindó el mejor rango de multiplicación de brotes a partir de explantes juveniles, pero 10 mg/L de zeatina fueron requeridos para secciones nodales de plantas en fase adulta.

Un requerimiento para una citocinina particular es algunas veces evidente por la inducción de embriogénesis y por la promoción de formación de brotes adventicios directos o indirectos; por ejemplo, cultivos de *Browallia viscosa* requirieron 2iP para la iniciación de brotes adventicios, la cinetina, BAP o zeatina no fueron efectivos.

**La especificidad de la citocinina en cultivo de brotes:**

Muchas demostraciones de requerimientos para una citocinina particular, han sido hechas en cultivos de brotes. El BAP promovió la proliferación axilar de yemas de *Castanea* en los experimentos de Vieitez y Vietez; mientras la cinetina no tuvo efecto.

La zeatina promovió el crecimiento de brotes principales y provocó solamente un escaso incremento en la proporción de yemas laterales.

En algunos cultivos, las citocininas tienden a producir brotes cortos en roseta, o sea brotes que crecen solamente después de su formación; así, el BAP y la cinetina producen brotes en roseta en cultivos de *Brassica campestris*, mientras los brotes axilares inducidos por 2iP se elongan satisfactoriamente; el 2iP y el BAP produjeron muchos brotes de *Elaeagnus angustifolia*.

El BAP produjo un alto rango de proliferación de brotes en *Gerbera*, pero una mejor calidad de brotes es obtenida utilizando 5-10 mg/L de cinetina.

Fonnesbech et al (1979) descubrió que las citocininas naturales, 2iP y zeatina fueron más capaces de promover el crecimiento y supervivencia de cultivos de brotes de *Asparagus plumosus* que la cinetina o el BAP, así los mejores resultados fueron obtenidos con PBA.

Una situación similar es encontrada en plantas de la familia Ericaceae, donde los componentes naturales zeatina y 2iP, son más efectivos que otras citocininas para la proliferación de brotes. El 2iP es más comúnmente utilizado por su bajo costo, pero en algunas especies, las mezclas de dos compuestos pueden dar mejores resultados que un solo componente.

En cultivo de brotes de *Gynura sarmetosa*, el BAP, la cinetina y el 2iP promueven la formación de brotes cuando se usan separadamente, pero cada uno produjo

alguna anomalía en los brotes obtenidos. Un crecimiento más rápido de brotes saludables fue obtenido al agregar los 3 compuestos simultáneamente.

Las mezclas de más de una citocinina han sido encontradas ser más efectivas en la multiplicación de brotes.

***Interacción auxina-citocinina:***

Skoog y Miller (1957) encontraron que la formación de brotes podría ser inducida predeciblemente desde el callo del tabaco usando relativamente bajos niveles de auxina y altos niveles de citocinina en el medio de crecimiento.

Desde este descubrimiento, muchos aspectos de diferenciación celular y organogénesis en cultivo de tejidos han sido mostrados estar controlados por una interacción entre concentración de citocinina y auxina. El balance entre los dos reguladores es requerido para iniciar el crecimiento o diferenciación en cultivo de tejidos.

Proporciones relativas de auxinas y citocininas no siempre producen resultados típicos; por ejemplo:

- La proliferación de brotes axilares en algunas especies puede ser promovido por la presencia de una auxina junto con una citocinina.
- Tejidos de monocotiledóneas pueden a menudo ser inducidos a formar callo en cultivo con altos niveles de auxina y la presencia de citocininas puede no ser esencial o importante.
- La organogénesis en monocotiledóneas es a menudo promovida al transferir el cultivo a un medio sin auxina, por la reducción de auxinas activas como 2,4 D o reemplazando 2,4 D con otra auxina.

Un balance entre auxina y citocinina es más a menudo requerido para la formación de brotes adventicios y meristemas de raíz. La concentración requerida de cada tipo de regulador difiere grandemente de acuerdo a la planta cultivada, las condiciones culturales y el compuesto usado; las interacciones entre dos clases de reguladores son a menudo complejas y más de una combinación de sustancias puede producir similarmente resultados óptimos.

La división celular parece estar regulada por la acción conjunta de auxinas y citocininas, cada una de las cuales parece influenciar diferentes fases del ciclo celular. Las auxinas ejercen un efecto en la replicación del ADN, mientras la citocinina parece ejercer algún control sobre los primeros eventos de la mitosis.

La división celular normal requiere sincronía entre la fase S y la división celular, mostrando que los niveles de auxina y citocinina en los cultivos necesitan ser cuidadosamente escogidos.

La última replicación de ADN en cultivo de células ha sido como una causa, un rearrreglo de cromosomas. Las células no están listas para entrar en mitosis sin

citocinina presente. El callo o cultivos en suspensión son iniciados en un medio que contiene una auxina, para finalizar el ciclo celular se confía en citocininas endógenas.

**Acido giberélico** (GA<sub>3</sub>): promueve la elongación y reprime la formación de brotes, de cualquier clase de tejido organizado (15).

Las giberilinas pueden fomentar también la dilatación de las células, sobre todo en plantas intactas, y esa capacidad puede plantear dificultades cuando se trata de determinar auxinas (por ejemplo, las giberilinas son activas en la prueba del primer internodio y la prueba de secciones de coleóptilos). Además, en ciertas pruebas, las giberilinas pueden realzar las actividades de las auxinas o modificar sus respuestas. Por consiguiente, cuando se prueban extractos brutos en algún bioanálisis, la estimulación total del crecimiento pueden causarlas dos o más hormonas, en lugar de la actividad de una sola hormona o auxina simple y deberá utilizarse una combinación de varias pruebas biológicas, físicas y químicas, a fin de determinar la naturaleza química del material activo.

Por lo común las semillas inmaduras representan la mejor fuente de giberilinas naturales.

En la actualidad existen cuando menos treinta y siete giberilinas conocidas. Algunas se encuentran solo en el hongo *Gibberella fujikuroi*, otras están presentes solo en plantas superiores y otras en ambas. Por lo menos dieciséis de las giberilinas conocidas se han aislado del hongo (GA1aGA4, GA7, GA9aGA16, GA24, GA25 y GA36) y veintisiete de plantas superiores (GA1aGA9, GA13, GA17aGA23, GA26aGA35). Al menos siete giberilinas (GA1aGA4, GA7, GA9 y GA13) aparecen tanto en el hongo como en algunas plantas superiores.

Se han aislado giberilinas a partir de gran variedad de plantas y se ha demostrado que muchos vegetales contienen numerosas giberilinas.

Las giberilinas se han definido como compuestos que contienen un esqueleto gibane y propiedades biológicas apropiadas. Algunos sugieren que las giberilinas contienen el esqueleto del enantiómero de giberelano. Este utiliza un sistema de numeración que corresponde al de otros diterpenos cíclicos, categoría a la que pertenecen todas las giberilinas.

Las principales diferencias entre las giberilinas conocidas son que algunas tienen diecinueve átomos de carbono y otras veinte y hay grupos de hidroxilos que pueden encontrarse presentes o ausentes en las posiciones 3 y 13. Todas las giberilinas de diecinueve átomos de carbono son ácidos monocarboxílicos, tienen el grupo COOH en la posición 7 y un anillo de lactona.

Se han encontrado algunos compuestos que son precursores de las giberilinas y que han demostrado tener débil actividad giberilínica en varios bioanálisis de

giberilinas. Tales productos son el caureno o sus productos de oxidación, como son el caurenol, el aurenal y el ácido caurenoico; su actividad depende probablemente de su conversión en una giberilina, dentro de la planta de prueba que puede ser, por ejemplo, el pepino silvestre, *Echinocystis macrocarpa*.

El efecto más sorprendente de asperjar plantas con giberilinas es la estimulación del crecimiento. Los tallos de las plantas asperjadas se vuelven generalmente mucho más largos que lo normal. Se estimula el crecimiento en los internodios más jóvenes y frecuentemente se incrementa la longitud de los internodios individuales, mientras el número de internodios permanece sin cambios. Pueden provocar la floración en muchas especies que requieren temperaturas frías, como la zanahoria, escarola, col y nabo.

Produce un incremento pronunciado de la división celular en el meristemo subapical y provoca el crecimiento rápido de muchas plantas rosetadas. Ese veloz crecimiento es resultado tanto del número mayor de células formadas como del aumento en expansión de las células individuales. Pueden terminar con el reposo de las semillas de muchas especies. En muchas plantas, la dominancia apical se realza mediante el tratamiento con giberilinas. Algunas plantas enanas de mucho follaje, crecen con un tallo simple, después del tratamiento.

Incrementan el tamaño de muchos frutos jóvenes, como las uvas y los higos. En vegetales como los pastos y el apio, la aplicación de giberilinas produce mayores aumentos del rendimiento que el que se obtiene en plantas no tratadas.

***Mecanismo de acción:***

Uno de los ejemplos mejor conocidos de la inducción de enzimas debida a las hormonas, es la producción de alfa amilasa provocada por las giberilinas en las aleuronas de cebada. El GA3 puede reemplazar a un factor productor de alfa amilasa, generado mediante la germinación de semillas de cebada. Los embriones de cebada producen una giberelina natural que se traslada al interior de las capas de aleuronas de los endospermos, donde se produce la síntesis de enzimas. Estas enzimas, incluyendo amilasas, proteasas y lipasas, descomponen rápidamente las paredes celulares de los endospermos e hidrolizan después los almidones y proteínas, liberando así los nutrientes y la energía necesarios para el desarrollo de los embriones. La actividad enzimática resultante de las giberilinas no se debe a la liberación de enzimas de alguna forma de enlace, sino al incremento de la actividad celular, debido a la formación de nuevas enzimas.

Las giberilinas provocan la estimulación de la síntesis de RNA en las capas de aleuronas, que puede requerir la expresión de los efectos giberilínicos. Se cree que las giberilinas modifican el RNA producido en los núcleos, y así puede éste ejercer su control sobre la expansión celular, así como sobre otras actividades de crecimiento y desarrollo vegetal.

Pueden provocar expansión mediante la inducción de enzimas que debiliten las paredes celulares. El tratamiento con giberilinas provoca la formación de enzimas

proteolíticas de las que puede esperarse una liberación de triptofano, precursor del AIA. Con frecuencia incrementan el contenido de auxinas. Asimismo, pueden transportar a las auxinas a su lugar de acción en las plantas. Otro mecanismo es la hidrólisis del almidón, resultante de la producción de alfa amilasa generada por la giberilinas, pudiendo incrementar la concentración de azúcares y elevando así la presión osmótica en la savia celular, de modo que el agua entra a la célula, y tiende a expandirla (24).

***Actividad fisiológica:***

Aplicado a plantas completas, las giberilinas pueden influenciar el crecimiento y desarrollo en diferentes vías (por ejemplo; por incremento del largo del tallo, promoviendo floración o induciendo fructificación). Muchos de los efectos de las giberilinas en las plantas completas son causadas por incremento selectivo o disminución en la biosíntesis y actividad de enzimas.

Un posible resultado es un cambio en la disponibilidad de auxina endógena. El ácido giberélico suprime la síntesis de fosfatasa y enzimas concernientes con la producción de algunos productos secundarios, pero la síntesis de nuevo de  $\alpha$ -amilasa y maltasa son estimuladas, por ejemplo durante la germinación de semillas de cereales.

***Efectos del ácido giberélico sobre cultivo de tejidos:***

Los tejidos pueden generalmente ser inducidos a crecer y diferenciarse sin giberilinas, así el ácido giberélico puede convertirse en un ingrediente esencial del medio para cultivar células a bajas densidades.

Cuando el ácido giberélico es agregado al medio de cultivo, produce efectos, los cuales son de naturaleza similar a las auxinas. Altas concentraciones de ácido giberélico inducen el crecimiento de células de callo no diferenciadas y pueden promover el crecimiento de callo en combinación con auxina y bajos niveles de citocinina.

Un factor de crecimiento, el cuál es probablemente una giberilina, es producida por los embriones al germinar en algunas especies de plantas y puede ser transmitida al endospermo antes que este tejido prolifere para formar callo en cultivo. Cuando la presencia de ambos, auxina y citocinina en un medio de crecimiento permiten la rápida formación de callo en las superficies cortadas del explante, la adición de pequeñas cantidades de giberilina (0.1 mg/L) o el reemplazo de auxina por giberilina usualmente inhibe el crecimiento de callo.

***Morfogénesis:***

Cuando el ácido giberélico es agregado al tejido de la planta en el medio de cultivo, este a menudo disminuye o previene la formación de raíces adventicias, brotes o embriones somáticos. Así un tratamiento anterior del callo o explante con giberilina o la adición de giberilina al medio junto con auxina o citocinina en concentraciones que podrían normalmente promover morfogénesis, es usualmente inhibitoria.

**Formación de brotes adventicios:**

En callo de tabaco la giberilina inhibió la formación de brotes, presentó con el tiempo formación de meristemoides y fue más represivo durante la incubación a oscuras que en luz. La inhibición ha mostrado no ser irreversible pero persiste por lo menos dos subcultivos en un medio libre de giberilina.

En algunas plantas el ácido giberélico sólo puede inducir formación de brotes adventicios, por ejemplo, callo de *Ranunculus scleratus*.

El compuesto puede también actuar como reemplazo de auxina en la inducción de formación de brotes, una relación precisa giberelina/citocinina puede ser requerida.

Alternativamente, la giberilina puede simplemente incrementar el número de órganos formados, la regeneración de brotes de callo de *Rosa hybrida* puede ser inducida por 1-5 mg/L de BAP, pero agregando 0.3-1 mg/L de giberilina se incrementa el número de brotes producidos. Agregando 5-50 $\mu$ M de giberilina al medio (en conjunto con AIB y BAP) aumenta la formación de brotes vegetativos a partir de segmentos de inflorescencia de remolacha azucarera.

La combinación de giberilina y citocinina es generalmente menos satisfactoria para la inducción de brotes que auxina y citocinina y los tejidos pueden ser transferidos a un medio sin giberilina para que ocurra desarrollo de yemas.

Los brotes formados en la presencia de giberilina pueden ser tenues y anormales.

El ácido giberélico puede también prevenir directamente la regeneración de brotes.

Algunas de las diferencias en la inhibición o promoción de formación de brotes adventicios por giberilinas puede ser debido al factor que el compuesto inhibe la iniciación meristemoides, pero es requerida para el desarrollo de brotes hasta que los meristemoides son formados.

**Rizogénesis:**

Inhibición: Normalmente el ácido giberélico inhibe la formación de raíz y la aplicación local y relativamente alta concentración (1-10 mg/L) del compuesto en la base de los cortes previene la formación de raíz, especialmente si las auxinas son aplicadas al mismo tiempo.

La formación de raíz en la base de los peciolos separados de hojas de frijol *Phaseolus* fue inhibida por aplicación tópica, esto fue fomentado cuando la giberilina fue aplicada a la lámina de las hojas.

La promoción fue especialmente pronunciada cuando el triptófano (un precursor bioquímico de AIA) fue colocado en la superficie de la hoja al mismo tiempo que la

giberilina. Esto y otra evidencia, permite mostrar que la promoción de la formación de raíces fue debido a que las giberilinas causan que la hoja produzca un incremento natural de auxina el cual fue transportado a la base del peciolo. Las giberilinas pueden estimular insignificadamente la iniciación de raíz de los discos de la hoja de tomate guardados en oscuridad, Colema y Greyson concluyeron que esto es porque la biosíntesis natural de auxina es incrementada.

Nanda et al (1972) encontraron que la formación de raíz en cortes de *Ipomoea fistula* era estimulada si ellas eran sumergidas en giberilina antes de ser colocadas en COMPOST. Anand et al (1972) obtuvo resultados similares, pero encontró que el pretratamiento con AIB fue más efectivo. El ácido giberélico también mejora el enraizamiento de brotes de *Coffea arabica*, si una solución de 25-50 mg/L era aplicada directamente a brotes.

La inhibición de enraizamiento causada por giberilinas es generalmente aumentada en la presencia de auxina, Coleman y Greyson (1977) propusieron que esto puede ser debido a una excesiva concentración total de auxina.

Este enfoque es apoyado por resultados de Rucker quien encontró que el ácido giberélico fue también capaz de promover la formación directa de raíz en fragmentos de hoja de *Digitalis* cuando lo aplicó con bajos niveles de AIA, pero fue inhibido cuando la concentración de AIA fue incrementada.

#### **Promoción:**

En algunas plantas sin embargo, el pretratamiento del material de plantas con giberilinas aumenta la formación de raíz cuando los cortes son colocados después en un medio inductor de raíz. El enraizamiento puede algunas veces ser promovido por giberilinas si estas son aplicadas a cortes en la ausencia de una auxina y las plantas (o al menos la zona de enraizamiento) es subsecuentemente guardada en oscuridad.

Como en caulogénesis, esto ha sido propuesto que el efecto del ácido giberélico en la formación de raíz es dependiente del tiempo de aplicación. Si el ácido giberélico era aplicado a cortes de *Pinus radiata* previamente cortados, se inhibe el enraizamiento. Aumento sin embargo el enraizamiento cuando se aplicó al existir la primera señal de formación de raíz observable, por corto tiempo, después fue otra vez inhibido.

Existen sin embargo, ejemplos de formación de raíz en la presencia de ácido giberélico y auxinas sintéticas:

- El número de raíces formadas por explantes de discos de hoja de tomate tratadas con 20 $\mu$ M de ácido indol-3-láctico fue incrementado al agregar 100  $\mu$ M de ácido giberélico.
- La inhibición de formación de raíz directa y brotes en hojas aisladas de *Begonia rex* por 1-10 mg/L de giberilina fue superada al agregar 2,4D a una concentración equivalente.

- La formación de raíz directa de *Helianthus tuberosus* fue estimulada cuando 0.35-3500 µg/L de giberilina fue agregada además de ANA (0.2 mg/L) y el explante fue guardado en la oscuridad, mientras en luz el ácido giberélico fue inhibido. Otras 6 giberilinas también dieron resultados similares.
- El ácido giberélico fue capaz de promover enraizamiento del cultivo de brotes de *Prunus* a 26°C en conjunto con la auxina IBA, debajo de esta temperatura, esto no tiene efecto.

#### **Embriogénesis y desarrollo de embriones:**

Aunque ocasionalmente se reportó ser prometedor el ácido giberélico ha sido generalmente encontrado como inhibidor de la formación de embriones somáticos. La adición de inhibidores de biosíntesis de giberilinas incrementó el número de embriones somáticos producidos por callo de *Citrus sinensis*.

El crecimiento (germinación) de embriones somáticos preformados de muchas diferentes especies puede ser estimulada por la incorporación de ácido giberélico (0.3-1 mg/L) en un segundo medio (post iniciación).

En algunas plantas el crecimiento de embriones de raíz es especialmente promovido, en otros la regeneración de brotes es estimulada.

Estos resultados concuerdan con las observaciones de Noma et al (1982) los niveles de giberilinas polares (el ácido giberélico es de este tipo) fue alto en células de zanahoria no diferenciadas y en cepas no embriogénicas. Cuando el embrión somático fue iniciado ellos contenían bajos niveles de giberilinas polares y estos compuestos fueron metabolizados rápidamente.

#### **Diferenciación celular:**

El ácido giberélico tiene un pequeño efecto en la diferenciación celular *in vitro* más allá mediando la acción de auxina. En plantas intactas, la formación de xilema es estimulada por el tratamiento con ácido giberélico o con auxina y ácido giberélico combinado.

La auxina es considerada ser la responsable de la diferenciación inicial de elementos del floema y xilema en cultivo de tejidos; aunque alguna promoción debido al ácido giberélico ha sido reportada.

En el cactus *Opuntia polyacantha* meristemos axilares se convierten en brotes frondosos en medio con 5-10 mg/L de BAP, pero produjeron espinas con 20-100 mg/L de ácido giberélico. Cuando 5-50 mg/L de ANA fueron usados, se formaron raíces alrededor de yemas localizadas en el procambium.

#### **Actividad enzimática:**

Las giberilinas influyen la biosíntesis o actividad de enzimas y pueden consecuentemente afectar la producción de productos secundarios en plantas *in*

*vitro*; por ejemplo la síntesis de amarantina y antocianina los cuales son inhibidos por la presencia de ácido giberélico en el medio. La pérdida de células de zanahoria produce antocianinas en estas circunstancias, esto es aparentemente debido a la ausencia de ácido p-cumárico, isoenzima CoA ligasa.

**Cultivo de meristemos:**

Una pequeña cantidad de ácido giberélico (típicamente 0.03-0.1 mg/L) es a menudo agregado al medio en cultivo de meristemos. Esto puede no siempre ser beneficioso o absolutamente necesario y existen resultados conflictivos. Mellor y Stace-Smith no encontraron un efecto apreciable en cultivo de meristemo de papa, pero otros investigadores han reportado que la adición de bajas concentraciones de ácido giberélico al medio conteniendo auxina y citocinina o citocinina sola ha aumentado el crecimiento de meristemo, inhibe la proliferación de callo, algunas veces fomenta puntas de raíz libremente, e incrementa la proporción de meristemos desarrollados en brotes. Efectos similares han sido notados en cultivo de meristemos de algunas otras plantas.

El ácido giberélico no asiste en el establecimiento de ápices de brotes de todas las plantas. Inhibe el crecimiento de meristemo de algunas clases de geranios, en rosas y lino, los ápices crecieron rápidamente y formaron hojas atenuadas anormales, pero no raíces.

**Cultivo de brotes y nudos:**

Valles y Boxus encontró que la adición de ácido giberélico (0.1-1mg/L dependiendo del genotipo) a un medio conteniendo 1-5 mg/L BAP, fue esencial para obtener multiplicación de brotes de algún cultivar de rosa híbrida, y un rango improbable de proliferación en otros.

Agregando 0.7 mg/L de ácido giberélico a 2.3 mg/L de BAP incrementó el rango de proliferación en cultivo de brotes de *Camellia saluensis* X *C. japonica*. Sustituyendo AIA (0.2 mg/L) por ácido giberélico en *Camellia*, causó solamente un incremento en el largo de brotes, no hubo proliferación de brotes.

Una combinación de ácido giberélico (0.01-0.1 mg/L) y cinetina (0.5-5 mg/L) sin auxina, ha sido encontrado que proporciona un crecimiento regulado altamente efectivo por el rápido incremento de brotes de papa en cultivo líquido en movimiento.

**Elongación de brotes:**

Los brotes son ocasionalmente tratados con ácido giberélico para incrementar el largo de los brotes durante la multiplicación o antes del enraizamiento, cuando es usualmente aplicado a un estado de elongación especial, después de la multiplicación de brotes y antes que el brote sea cosechado.

El tratamiento puede ser beneficioso al utilizar un alto nivel de citocinina y se han producido muchos brotes cortos.

***Integridad apical:***

El tratamiento con citocinina utilizado para promover la proliferación axilar de brotes, puede causar brotes desarrollados con más que un meristemo apical. En fresa, el ácido giberélico puede ayudar a preservar la integridad de yemas apicales durante el cultivo de brotes.

Anderson H.M., et al (1982) mostrarán que 0.1 mg/L de ácido giberélico eliminarán la formación de plantas anormales multiápice, las cuales fueron causadas por combinaciones de BAP e IBA favorables a la rápida proliferación de brotes.

***Efectos perjudiciales:***

En la mayoría de las plantas, el uso de giberilinas en medio de cultivo es perjudicial, produciendo brotes elongados con hojas angostas.

***Acido abscísico:*** se utiliza en casos muy especiales, estimula la sincronización durante la embriogénesis en ciertos cultivos, también inhibe el crecimiento (15).

Hay procesos, como la germinación de las semillas, la supresión del crecimiento de brotes y el letargo de las yemas, que los inhibidores controlan, al menos en parte. Desde 1949, los científicos han clasificado los inhibidores, por lo general, como uno de los principales grupos de reguladores vegetales. Se han encontrado inhibidores en casi todas las partes de las plantas. Los que se encuentran en los tejidos del estilo pueden retrasar el crecimiento del tubo polínico. Hay inhibidores como la juglona que pueden ser excretados por las raíces u hojas de algunas plantas o que pueden ser resultado de la descomposición de partes vegetales.

Los inhibidores naturales del crecimiento comprenden un grupo muy variado de compuestos; aunque los más comunes son las sustancias orgánicas aromáticas. Muchos de ellos son compuestos de fenil, incluyendo fenoles, ácidos benzoicos y otros compuestos de cadenas más largas. El ácido gálico y el siquímico son derivados del ácido benzoico. El gálico se encuentra comúnmente en los frutos en maduración.

Se ha aislado el ABA de hojas, tallos, rizomas, tubérculos, yemas, polen, frutos, embriones, endospermos y las cubiertas de semillas de más de treinta especies vegetales, incluyendo algunas tan distintas como papa, frijol, manzano, aguacate, helecho, sauce, tilo, rosal, durazno, coco y varias hierbas. El compuesto se encuentra presente habitualmente en tejidos maduros y senescentes; pero se ha encontrado también en hojas y frutos jóvenes.

El ácido abscísico interactúa con los promotores del crecimiento, por lo que tiene efectos importantes en los fenómenos del crecimiento. Parece actuar como inductor general del envejecimiento, y frecuentemente las aplicaciones de ABA en el follaje provocan cambios en el color senescente de las hojas. Fomenta la abscisión de las hojas en plantas intactas, flores y frutos.

Inhibe el crecimiento de muchas plantas y partes vegetales. Produce una inhibición del crecimiento de los brotes y las hojas; sin embargo, se requieren con frecuencia varios tratamientos de ABA, debido a que sus efectos perduran tan solo un período breve.

Prolonga el reposo de muchas semillas. Inhibe la germinación de semillas cuyo período de reposo ha terminado, provoca reposo también en las yemas de ciertas especies, incluyendo algunos frutales de hoja caduca, cítricos y papas (24).

**Ocurrencia y actividad de ABA:**

El ácido absícico es otra sustancia que ocurre naturalmente en el crecimiento. La molécula tiene dos formas isoméricas cis y trans, la cuál depende de la posición del grupo carboxil terminal insertado en C-2; el isómero cis es el más común en la naturaleza y las plantas pueden convertir el isómero trans en la forma cis. Existe también un átomo de carbono asimétrico en la posición C-1 la cual resulta siendo (+) y enantiómeros (-), los cuales no son interconvertibles biológicamente. El ABA ( $\pm$ ) vendido por químicos, es una mezcla de ambos; solamente la forma (+) (la cuál no se encuentra en la naturaleza) produce respuestas rápidas en plantas. Sin embargo, respuestas al ABA las cuales solamente se desarrollan después de una prolongada exposición pueden ser iniciadas por el enantiómero (-).

El ácido absícico es producido por plantas directamente desde el ácido mevalónico (MVA) o de la rotura de los pigmentos del carotenoide (los cuales son también derivados del MVA). La biosíntesis ocurre en plastidios (especialmente cloroplastos). El herbicida el cuál inhibe la producción natural de carotenoides puede prevenir la biosíntesis de ABA.

El ácido absícico se encuentra en plantas y es el más comúnmente identificado en un gran número de otros compuestos naturales estructuralmente relacionados los cuales tienen actividad regulatoria en las plantas en crecimiento.

Es a menudo visto como un inhibidor del crecimiento, parcialmente porque puede controlar la dormancia de semillas y yemas, pero más particularmente porque inhibe la acidificación de la pared celular promovida por auxina y permite la elongación celular.

El ácido absícico tiene muchos otros papeles reguladores en plantas, así como la regulación del cierre de estomas, control de agua y el canal de iones en las raíces, la abscisión de hojas y senescencia.

En cultivo de tejidos algunas veces se promueve la morfogénesis o crecimiento. La cantidad presente en cultivo de plantas puede ser determinada por cromatografía de gas, espectrometría de masas o Elisa, siguiendo la purificación por cromatografía líquida a alta presión.

El canal del ácido absícico dentro de los tejidos parece ser por simple difusión de moléculas no disociadas, los aniones son atrapados dentro de las células.

**ABA en cultivo de tejidos:****Efectos del crecimiento del callo:**

El ácido absísico usualmente inhibe el crecimiento de callo. Sankhla y Sankhla reportaron que 1 mg/L fue marcadamente inhibitorio de la formación de callo en *Ipomoea*, pero generalmente, concentraciones entre 5 y 50 mg/L parecen ser necesarias para causar un 50% de inhibición del crecimiento de la célula.

Esta respuesta es usualmente obtenida con bajas concentraciones de ABA, altos rangos brindan descensos correspondientes al peso del callo producido.

**Efectos en morfogénesis:****Brotos adventicios:**

Se ha sido observado que influye la morfogénesis en un número de plantas. El primer reporte fue dado por Heide (1968); quién reportó que la formación de brotes y yemas en hojas aisladas de *Begonia X Cheinantha* fue aumentada cuando las hojas fueron tratadas con ABA y se inhibieron cuando ni auxina ni giberelina fue aplicada. La variación estacional en la capacidad de hojas de *Begonia* de producir yemas y brotes se considera estar asociado con variación en niveles endógenos de ABA.

Shepard (1980) encontró que agregando ABA al medio de crecimiento (0.05-0.2 mg/L, dependiendo de la variedad) causó morfogénesis.

Niveles naturales de ABA han sido observados corresponder al estado maduro de los tejidos (Tanimoto et al, 1985). Agregando 100 $\mu$ g/L de ABA al medio en el cual segmentos de internudo de *Torenia* fueron cultivados, estimulan la producción de yemas de flores en explantes previamente vegetativos. Una gran cantidad de flores ocurre cuando el ABA dentro de los tejidos (la suma de recursos endógenos y exógenos) fue entre 16 a 20 $\mu$ g/g.

**Embriogénesis:**

El ABA es esencial para el normal crecimiento de embriones somáticos y solamente en su presencia ellos parecen embriones zigóticos en su desarrollo y estructura. La manipulación de niveles endógenos y exógenos de ABA incrementa la frecuencia de embriones que alcanzan madurez y pueden asistir el manejo de grandes poblaciones de embriones somáticos los cuales pueden ser requeridos para la propagación en masa.

El insignificante impedimento del desarrollo de embriones causado por 0.03 mg/L de ABA fue observado por Ammirato (1973,74), y lo encontró asociado con la eliminación de formas anormales de embriones (así como embriones con cotiledones unidos o múltiples, hojas maduras en lugar de cotiledones u otras estructuras accesorias) fueron formadas en *Carum* (cultivo en suspensión) especialmente bajo luz. La efectividad de ABA en la disminución, la proporción de

embriones anormales y asistiendo y sincronizando la maduración de embriones (conversión) ha sido confirmado en otras especies.

***Efectos inhibitorios:***

Muchos autores han notado una acción inhibitoria del crecimiento proveniente de ABA exógeno en embriogénesis y en el crecimiento de embriones somáticos y zigóticos, pero estos reportes son raros y a menudo describen los efectos de altas concentraciones del regulador. Aunque 0.02-2.6 mg/L de ABA tiene pequeños efectos durante el desarrollo de estados tempranos globulares o estados de embriones somáticos formados en cultivos de zanahoria, disminuye el crecimiento de los diferentes estados embrionarios.

La formación de embriones en *Citrus sinensis* es suprimida por 11-21 mg/L de ABA o altas concentraciones.

Los embriones del último estado pre-formados pueden estar completamente detenidos en su crecimiento por 26.4 mg/L de ABA, pero se mantienen viables (siempre aunque ellos pierden clorofila) y continúan desarrollando y creciendo cuando el ABA es removido. El tratamiento con ABA puede por lo tanto ser usado para facilitar el almacenamiento de embriones necesarios en el futuro para la propagación de plantas. La inhibición de embriones somáticos por ABA es muy similar a la inhibición del crecimiento de embriones zigóticos lo cual si induce naturalmente, esto sirve para guardar embriones en estado latente, previniendo la germinación precoz.

***Posible modo de acción:***

Los diferentes efectos de ABA sobre los tejidos de plantas cultivadas mostró que puede modificar la síntesis de citocinina o actividad, como ha sido encontrada en varios test de plantas completas. El efecto aditivo o sinérgico de ABA con auxinas es la promoción de enraizamiento o cortes reportados por Bam et al, podría ser explicado de la misma forma. El ácido absísico tiene efectos opuestos a las sustancias fenólicas y puede, por ejemplo, aumentar la oxidación de AIA la cual muchos fenoles parecen prevenir.

El ABA inhibe la respiración a oscuras mitocondrial, estimulada por el ácido giberélico.

***Compuestos orgánicos naturales***

Existe una larga lista de compuestos naturales que se han adicionado ocasionalmente a los medios de cultivo, como fuentes de nitrógeno reducido, reguladores de crecimiento, carbohidratos y otros. Entre estos compuestos se encuentran: el agua de coco, el jugo de tomate, el extracto de levadura, extracto de tubérculos de papa y otros.

### **Agentes gelificantes**

Comúnmente se ha empleado el agar como un sistema de soporte para la preparación de medios de cultivo, en concentraciones de 0.6 a 1%. Otros gelificantes de uso reciente son: el gelrite y el phytigel, los cuales se utilizan en concentraciones menores (0.2%), son más económicos pero tienen una menor durabilidad.

### **5.3.2 Preparación del Medio de Cultivo**

Es necesario preparar el medio de cultivo utilizando agua bidestilada o agua desmineralizada destilada. Se debe evitar el almacenamiento prolongado del medio para evitar la acumulación de contaminantes; todas las sustancias químicas para su preparación deben de ser de un alto grado de pureza.

El procedimiento para la preparación de los medios dependerá del tipo de medio, de su consistencia y de la presencia de componentes termolábiles. En general, se pueden distinguir los siguientes tipos (12):

#### **Medios semisólidos sin sustancias termolábiles**

La preparación de medios semisólidos sin sustancias termolábiles consta de los siguientes pasos:

- Incorporación de los macronutrientes, micronutrientes y vitaminas
- Ajuste del pH
- Adición y solidificación del agente gelificante (agar, gelrite o phytigel)
- Distribución del medio de cultivo en los recipientes
- Esterilización en el autoclave

#### **Medios líquidos con o sin sustancias termolábiles**

Para su preparación se sigue el procedimiento anterior, pero sin adicionar el agar y sin esterilizar al autoclave. La esterilización se realiza por filtración en el caso de sustancias termolábiles.

#### **Medios semisólidos con una o más sustancias termolábiles**

Para la preparación de medios semisólidos con una o más sustancias termolábiles se sugieren los siguientes pasos:

- Incorporación de los compuestos que pueden ser esterilizados en el autoclave (macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y otros).
- Ajuste del pH
- Adición y solidificación del agente gelificante
- Esterilización en el autoclave
- Incorporación de las sustancias termolábiles, previamente esterilizadas por filtración, en la cámara de transferencia (los componentes esterilizados en el autoclave se deben de mantener a una temperatura entre 40 y 50°C para evitar su gelificación).

- Distribución del medio de cultivo en los recipientes, previamente esterilizados al autoclave.

#### **5.4 Condiciones ambientales para la incubación**

Es conveniente que los cultivos sean incubados en ambientes controlados, por lo menos en lo que se refiere a la luz y a la temperatura. Las respuestas morfogénicas pueden ser alteradas por la temperatura de incubación, así como, por la calidad, intensidad y duración de la luz.

Para propósitos generales se sugiere utilizar, en el establecimiento de los cultivos, una fuente luminosa compuesta de lámparas fluorescentes (tipo "luz de día") y lámparas incandescentes (tipo "bombilla 100 watts"), que brinden entre 1,000 y 4,000 lux de iluminación. Recientemente se han estado utilizando lámparas especiales tipo "grow-green" y "agrolight", que proporcionan una longitud de onda de mejor calidad (450-500 nm), para los explantes, pero su uso no es generalizado. Comúnmente se utiliza un ciclo de fotoperíodo de 16 horas de luz por ocho horas de oscuridad, existiendo algunas variantes como 12 hrs / 12 hrs ó 18 hrs / seis hrs. (12)

El fotoperíodo, la longitud de onda y la intensidad lumínica deben ser considerarse cuando se realiza el cultivo de tejidos. Cuando se adiciona al medio azúcar, se trata de suministrar al explante una fuente de carbono, ya que inicialmente tales explantes no están en capacidad de realizar fotosíntesis, inclusive en el caso de los callos, éstos pueden presentar un mejor crecimiento cuando se les coloca en completa oscuridad.

Sin embargo cuando se trata de morfogénesis, debe tenerse en cuenta la importancia de la luz. En varios cultivos como espárragos y tabaco, la ausencia de luz trajo como consecuencia la disminución o supresión total de formación de brotes.

Cada especie requiere un determinado fotoperíodo para su crecimiento, y existe, además, un requisito determinado para el tipo de organogénesis que se pretende lograr.

La alternancia de luz y oscuridad debe ser estudiada en cada caso, a pesar de que en cultivo de tejidos, puede presentarse un requisito fotoperiódico similar al de las plantas crecidas *extra vitro*. Se ha demostrado en algunas plantas que la longitud del día influye los niveles endógenos de auxinas y citoquininas.

En cuanto a la longitud de onda, debe recordarse que muchos eventos morfogénicos son controlados por el fitocromo, pigmento vegetal con dos picos de absorción y fotorreversibles. Este pigmento podría controlar las respuestas ya sea por activación o represión diferencial de genes o por ambas causas.

Relacionado con la fotosíntesis debe tenerse presente que los principales pigmentos fotosintéticos, clorofila *a* y clorofila *b*, tienen sus espectros de absorción

de 440 a 680 nm (clorofila *a*) y 470 a 650 nm (clorofila *b*); tanto la luz roja como la azul son necesarias para la realización del proceso fotosintético.

La luz azul puede también mediar algunas respuestas. El espectro de acción para algunas respuestas a luz azul tienen su máximo a 365 nm, lo cual puede implicar receptores del tipo flavina. (15)

En general, temperaturas entre 25-28°C son adecuadas para el establecimiento de los cultivos, con una humedad relativa entre 70 a 80%.

Las temperaturas pueden variar de planta a planta. Se afirma que en los tejidos de plantas tropicales puede esperarse mejor crecimiento a temperaturas mayores que las apropiadas para el cultivo de tejidos de plantas de zonas templadas. Pueden lograrse, además, distintos tipos de respuesta dependiendo de la temperatura a la cual se crecen los cultivos. En el caso de cultivos de cítricos, el potencial embriogénico se redujo cuando se disminuyó la temperatura de 27°C a 12°C. Sin embargo, en algunas especies de *Brassica* la embriogénesis somática se aumenta en la medida en que se eleva la temperatura del cultivo; en el caso de *Eschscholzia* los tratamientos con baja temperatura superaron parcialmente la latencia de embriones somáticos. Se consiguen, además, respuestas diferentes alternando las temperaturas diurnas y nocturnas, como en el caso de *Helianthus tuberosus* donde la morfogénesis de raíces fue mejor cuando se utilizaron temperaturas diferentes durante el día y la noche.

La interacción temperatura-humedad es otro factor que debe tenerse en cuenta en el cultivo de tejidos, no sólo por factores de crecimiento, sino por aspectos sanitarios, ya que en ocasiones temperatura y humedad altas son causales de proliferación fúngica. (15)

En cuanto a la incubación es importante considerar las siguientes recomendaciones:

- Sellar el material con cinta plástica o sellador especial, para evitar contaminaciones.
- Identificarlos con datos del material vegetal, fecha, responsable, medio y fase de cultivo.
- Nunca abrirlos después de sellados, a menos que sea para cambiar de medio o eliminar el material.
- No cambiarlos de lugar y verificar las condiciones de incubación
- Si se contamina algún material, no abrirlo dentro del cuarto de incubación y esterilizarlo en el autoclave antes de eliminar el material. (12)

### **Subcultivo**

A pesar de que se supone que tanto en los callos como en las suspensiones celulares existe una capacidad de proliferación celular indefinida, se presentan dos

fenómenos importantes: la pérdida de potencial morfogenético y la viabilidad genética.

La pérdida de potencial morfogenético es también variable dependiendo de las especies. Por ejemplo, en el caso de callos de *Convolvulus* se ha visto que después de tres o más subcultivos, algunas líneas pierden su potencial morfogenético. De igual forma se ha observado el fenómeno en callos de *Brassica*. Algunos cultivos de callos de zanahoria mantenidos por períodos largos, también han mostrado esta pérdida de capacidad de diferenciación. Sin embargo, en la última especie se ha visto una cierta capacidad de restauración de la habilidad morfogenética cuando se han adicionado citoquininas al medio.

Son varias las teorías que tratan de explicar esa pérdida de capacidad morfogenética.

Una de las teorías postula que la producción de brotes (de raíz o tallo) se produce en los callos a partir de centros organizados de división celular (meristemoides), los cuales se derivan del explante inicial. Estos meristemoides pueden desaparecer gradualmente por los repetidos subcultivos y la desorganización celular.

Una segunda teoría propone que la pérdida de habilidad morfogénica puede deberse a la reducción de niveles endógenos de los reguladores de crecimiento.

Finalmente, también se ha atribuido el fenómeno a la acumulación de anormalidades cromosómicas durante los distintos cultivos, debido a que se han observado evidencias de aberraciones cromosómicas que incluyen cambios en el número (aneuploides y poliploides) o en el arreglo de cromosomas (deleciones y translocaciones).

En cuanto a la variabilidad genética observada en cultivo de tejidos, ésta es más pronunciada en cultivos de callos y en plantas formadas a partir de ellos. La variación puede resultar de segregaciones genéticas, mutaciones, cambios en el número y estructura de los cromosomas, reversión a estados juveniles, segregación de genomas extranucleares.

Esta variabilidad genética puede constituir un problema cuando se trata de clonación de plantas, pero puede ser aprovechada en la selección de células, callos o individuos tolerantes a ciertos factores químicos, edáficos, ambientales, etc (15).

### **5.5 Embriogénesis somática**

Es el proceso de organización durante el cual una célula somática se comporta como un cigoto y sigue todas las etapas de la embriogénesis para dar lugar a la formación de una planta (9). Son estructuras bipolares con un eje radical-apical, y no poseen conexiones vasculares con el tejido materno (generalmente aislados

por una epidermis). Esta estructura es capaz de crecer y formar una planta completa (1).

Esta técnica tuvo su origen en el concepto de totipotencia enunciado por Haberland en 1902. Totipotencia significa que todas las células vegetales tienen la capacidad de formar plantas completas.

La totipotencialidad de la célula vegetal se debe a la particularidad que tiene toda célula vegetal de perder su diferenciación (desdiferenciación). Los primeros resultados a favor de esta teoría fueron los obtenidos por Reinert en 1958 y Steward et al en 1958. Estos investigadores lograron inducir la formación de embriones somáticos a partir de raíces de zanahoria (1).

Los embriones somáticos son estructuralmente similares a los embriones encontrados en semillas verdaderas.

Los embriones a menudo se desarrollan en regiones equivalentes al suspensor de embriones zigóticos, vienen a tener ambos un brote y un polo con raíz. Para distinguirlos del zigótico o embrión proveniente de semillas, los embriones producidos de células o tejidos del cuerpo de la planta son llamados embriones somáticos. El proceso es denominado embriogénesis. La embriogénesis somática es ahora ampliamente observada y es un evento documentado, el término embrión somático ha sido el término preferido respecto de embrión que se utilizó al inicio.

#### **5.5.1. Embriogénesis directa o indirecta**

La embriogénesis somática puede acompañarse de un fenómeno llamado callogénesis o formación de un callo (conjunto desorganizado de células capaces de dividirse, pudiendo ser meristemáticas o embriogénicas); embriogénesis indirecta. Es el resultado de la totipotencialidad. (1)

En la embriogénesis directa los embriones se originan directamente de los tejidos sin que haya proliferación de callo. Se obtiene un menor número de embriones diferenciados, pero con una mayor uniformidad genética de los individuos obtenidos.

En la embriogénesis indirecta la proliferación de callo y el tejido embrionario están asociados con el desarrollo del embrión, produciendo un callo secundario (o de segunda generación, propagación del callo primario) y las células embriogénicas provienen de la multiplicación de células inducidas. Se obtiene un mayor número de embriones con una mayor variabilidad genética entre individuos (14).

## 5.6 **Morfogénesis**

### **Natural e Inducida:**

Nuevos órganos así como brotes y raíces pueden ser inducidos a formarse en tejidos de plantas cultivadas. Los órganos originados son adventicios. La creación de nuevas formas y organización, es llamada morfogénesis u organogénesis. Los tejidos u órganos con esta capacidad son llamados morfogénicos u organogénicos.

Ha sido posible obtener brotes adventicios (caulogénesis) y raíz (rizogénesis) separadamente. La formación de hojas adventicias *in vitro* usualmente excluye la presencia de brotes de meristemas. Algunas hojas aparecen sin aparente formación de brotes, existen dos opiniones al respecto; si las hojas surgieron de nuevo, o si un brote meristemático estaba presente al inicio y subsecuentemente fracasó en desarrollarse.

### **Flores iniciales o partes del perianto:**

La formación de flores o partes de flores es rara, ocurre solamente bajo circunstancias especiales y no es relevante para la propagación de plantas. Caulogénesis, rizogénesis y embriogénesis son importantes para la multiplicación de plantas. Nuevas plantas son rara vez obtenidas en cultivo por la unión de brotes y raíces independientemente formados en el callo; esto es porque uniones vasculares entre los dos tienden a no ser viables. La regeneración de plantas es por lo tanto mejor lograda en brotes adventicios los cuales después son enraizados. Brotes, raíces y embriones somáticos arriban de células únicas, o grupos de células, los cuales son inducidos por condiciones culturales los cuales se convierten en centros de división activa de las células (meristemas morfogénicos) cada uno capaz de producir un órgano de una clase.

La morfogénesis ha sido observada *in vitro* en numerosas plantas de muchos géneros, pero no puede ser inducida universalmente.

### **Morfogénesis Directa e Indirecta:**

Meristemas morfogenéticos pueden teóricamente ocurrir en dos distintas vías:  
De células diferenciadas de una pieza nuevamente transferida de tejido completo de la planta, sin la proliferación de tejido no diferenciado.  
De células no especializadas, no organizadas y células no diferenciadas, de callo o cultivo en suspensión.

Hicks (1980) describió estos dos métodos de morfogénesis como organogénesis directa e indirecta respectivamente. En la práctica no siempre es posible distinguir entre los dos métodos. Meristemas directamente formados destinados a convertirse en brotes o embriones somáticos pueden proliferar o formar un tejido regenerativo similar en apariencia al callo. Así los meristemas pueden también estar rodeados por callo no diferenciado lo que dificulta acertar sobre su origen.

Callo superficial formando brotes del meristemo puede a menudo estar separado de esta clase de cultivo. Alternativamente, meristemos de brotes pueden formarse dentro del callo, el cuál esta aún unido a o dentro de los tejidos del explante primario, o puede ser producido simultáneamente al callo o células superficiales del explante.

**Competencia y Determinación:**

En las células altamente especializadas de plantas intactas no se observa nunca que cambien su estado diferenciado de existencia. Similarmente, algunas células no se convierten en morfogénicas y se supone que han perdido la capacidad de formar nuevas plantas. Las células que han retenido su capacidad para una particular clase de diferenciación celular o morfogénesis o la han adquirido en respuesta a un estímulo apropiado son llamadas competentes.

Algunos consideran que la competencia morfogénica usualmente conlleva una habilidad para proceder hacia una vía particular desarrollada; de acuerdo a esta hipótesis, una célula, la cuál es competente para experimentar morfogénesis de brotes puede no ser competente en la formación de raíz. Es también considerado que si las células del explante no son realmente competentes para un cultivo *in vitro* o un medio con o sin reguladores del crecimiento.

Elas son capaces de responder a un estímulo organogénico proporcionado por una combinación particular de reguladores del crecimiento agregados al medio.

**Morfogénesis y diferenciación celular:**

La competencia es el primer paso en la dedicación de una o más células no diferenciadas (estado 1) hacia la morfogénesis, o alguna otra clase de desarrollo especializado (estado 2). El segundo estado de diferenciación es entonces, la inducción de determinación en células competentes. Células individuales o grupos de células que se dice que son determinadas, cuando ellas han sido encomendadas a seguir una vía particular de desarrollo genéticamente programado, por ejemplo, una clase particular de morfogénesis (estado 3) y puede continuar hacia un resultado sin influencia de reguladores del crecimiento. Células determinadas diferenciadas a convertirse en el componente del tejido especializado de plantas maduras. En la práctica, la competencia adquirida y la determinación son a menudo difíciles de separar.

En ambas organogénesis directa e indirecta, al mismo estado, durante la formación de nuevos meristemos de los cuales los órganos arriban, las células componentes adoptan un programa diferente inherente, el cuál decidió su patrón subsecuente de desarrollo. En el caso de cultivo de tejidos no organizado, el programa es aparentemente inducido por el efecto de los reguladores del crecimiento (en combinación con la presencia de factores nutricionales correctos).

Así reguladores del crecimiento pueden también ayudar a inducir la morfogénesis directa, las células en algunas partes de la planta parecen ser parcialmente predeterminadas a una vía particular morfogénica, necesitan solamente un

insignificante cambio en el medio ambiente para inducir los tejidos de algunos explantes a formar un meristemo morfogénico en lugar de progresar en volverse una célula diferenciada dentro de la planta intacta. Esto se observa claramente en tejidos embriogénicos.

La morfogénesis de las células, las cuales son encomendadas en cada fase del desarrollo de las plantas se denomina proceso permisivo, mientras que las células inducidas que se tornan morfogénicas por la influencia de reguladores del crecimiento endógenos o exógenos, se denomina proceso inductivo. La morfogénesis permisiva e inductiva son sinónimos de morfogénesis directa e indirecta.

Centros morfogénicos provienen de solamente una porción relativamente pequeña del número total de células en cultivo. En muchas circunstancias esto podría ser claramente ventajoso, ser capaz de incrementar este número.

La extensión de predeterminación o encomendación morfogénica varía entre diferentes tejidos de plantas completas. Algunos observadores creen que las células de las cuales los meristemas producen órganos, son formadas solamente de una célula, en la población de células, son competentes.

Una hipótesis alternativa fue propuesta por Street (1977), quién mostró que muchas células pueden tener la capacidad de volverse competentes, nuevamente formando meristemas, pueden preferencialmente aceptar metabolitos esenciales de células de alrededor.

Existe, sin embargo, evidencia de que meristemas adicionales son primariamente inhibidos del desarrollo por el crecimiento.

### **5.7 Usos más frecuentes del cultivo de tejidos (15)**

- El uso más frecuente de la técnica es el de la rápida multiplicación de individuos vegetales. Esta rapidez se debe, entre otros factores, a la posibilidad de obtener un elevado número de explantes a partir de una planta donante y a la velocidad de multiplicación debida al control tanto del medio, como de las condiciones ambientales en las cuales se lleva a cabo la multiplicación.
- Un uso bastante extendido de la técnica es la obtención de plantas libres de virus, fundamentalmente cuando se usa el meristemo como explante, ya que distintas teorías tratan de explicar la no presencia de virus en los meristemas.
- Se han propuesto además las zonas verde-oscuras, de las plantas afectadas por virus, como explante para la obtención de plantas libres de tales patógenos.

- En la mejora vegetal el cultivo de tejidos juega un papel determinante, ya que a través del cultivo *in vitro* es posible la obtención de individuos haploides, la duplicación posterior de su número cromosómico dará origen a diploides, triploides, etc., homocigóticos. Es frecuente además la obtención de mutantes que pueden constituir una gran perspectiva en el mejoramiento. Los híbridos interespecíficos que dan como resultado embriones que abortan rápidamente, pueden lograrse por la técnica de recuperación. El intercambio y almacenamiento de germoplasma es otra utilización frecuente de la técnica. La Ingeniería Genética (para obtención de plantas transgénicas) y la fusión de protoplastos, son también una gran ayuda para la mejora de las plantas, al igual que la selección por resistencia a un agente determinado.
- Producción de metabolitos: es el caso de las fermentaciones y en ocasiones la producción de metabolitos de uso en farmacia, cosmetología, distintos productos biológicos, etc.
- La recuperación de la producción debida a aspectos sanitarios y/o a la obtención de nuevas variedades en cultivo de tejidos es también uno de los frecuentes usos de la técnica.
- Finalmente, debe anotarse que muchos estudios básicos en el campo de la Fisiología, Bioquímica, Genética, Histología, Organografía y otras áreas, se facilitan si se recurre al uso del cultivo *in vitro*.

### **5.8 Perspectivas**

A pesar de los múltiples logros del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, se hace necesario hacia el futuro el estudio de algunos eventos que aún no están completamente dilucidados.

Por ejemplo, en el campo de la morfogénesis los logros han sido en la mayoría de los casos, alcanzados en forma empírica y no existen reglas generales. Se hacen necesarios los estudios sobre el control y expresión morfogénica.

Por otro lado, la micropropagación de plantas leñosas presenta en la actualidad algunas limitaciones que son necesarias superar. Además, en plantas leñosas como herbáceas existen problemas en la fase de adaptación *extra vitro* y son un serio problema que es necesario superar. La producción de fenoles y problemas de vitrificación son también limitantes para el uso de la técnica.

Con respecto al control de enfermedades y contaminantes, se hace necesario emprender una serie de investigaciones que permitirían un mayor avance.

La técnica de fusión de protoplastos no está aún completamente perfeccionada. Igual sucede con el cultivo de polen y de embriones.

En cuanto a la obtención de mutantes *in vitro* es necesario tener presente que en algunas oportunidades las respuestas *in vitro* y *extra vitro* pueden ser diferentes.

Las variaciones epigenéticas y somaclonales deben ser objeto de estudios más profundos. Finalmente en los ensayos de crioconservación se presentan algunas disrupciones de tejidos y se produce algún tipo de inestabilidad de los materiales. Además, la capacidad de regeneración después de la crioconservación en muchos casos se ve disminuida, lo cual constituye una seria limitación.

Es pues muy amplio el panorama de las investigaciones que deben llevarse a cabo, con el fin de lograr una mejor comprensión de los procesos involucrados en el cultivo de tejidos vegetales (15).

### **5.9 Efectos del Genotipo**

Algunas especies vegetales parecen más aptas y presentan mayores respuestas en el cultivo *in vitro*; existen diferencias en la regeneración de plantas que son dependientes de genotipo.

Se han descrito efectos diferentes en las respuestas del cultivo de *Anthurium andreanum* y *A. scherzerianum*; así también se conocen respuestas muy diferentes entre distintas especies de *Pelargonium*.

En el caso de algunas umbelíferas, como la zanahoria, se ha encontrado que son un grupo de plantas de rápida regeneración. Sin embargo, pueden presentarse diferencias dentro de los géneros, las especies y aún dentro de variedades, diferencias que han sido atribuidas al genotipo.

En estudios sobre embriogénesis somática con 12 genotipos diferentes de maíz, se encontraron diferentes frecuencias de embriogénesis en los distintos genotipos utilizados.

En algunas oportunidades las diferencias de respuesta entre los distintos taxa, pueden reflejarse en los requerimientos nutritivos y hormonales para la diferenciación.

Respuestas debidas a genotipo se han encontrado, entre otras, en alfalfa (*Medicago sativa*) y en trébol (*Trifolium praetense*) (15).

### **5.10 Efectos de posición y competencia**

Aunque en todas las células de un organismo se considera que existe el mismo genotipo, existen fuertes diferencias entre célula y célula, y entre distintos tipos de órganos en cuanto a capacidad de regeneración en cultivo de tejidos. Se

considera en general que los tejidos embriogénicos, meristemáticos y reproductivos parecen tener una mayor propensión para el crecimiento y morfogénesis en cultivo de tejidos. Las células de embriones inmaduros de maíz forman embriones adventicios y brotes aéreos con mayor facilidad que las de los embriones maduros.

En el caso de *Pennisetum purpureum* en el desarrollo de cultivo de callos, se observó que la mejor respuesta se obtenía a partir de los tejidos de la base de la hoja; esto se observó en diferentes plantas (15).

## **VI METODOLOGÍA**

Debido a que únicamente se tenían tres plantas de *Hoffmania sessilifolia* L., de las cuales se obtuvieron las muestras para realizar el estudio, no se tuvieron repeticiones en los diferentes tratamientos. Los experimentos fueron de tipo observacional.

### **1 Selección de especies a conservar inicialmente**

El Centro de Datos para la Conservación, del Centro de Estudios Conservacionistas, posee información sobre las 1171 especies endémicas de Guatemala, en cuanto a su descripción, taxonomía, distribución y rango; según la clasificación de The Nature Conservancy entre otras.

En el área de Botánica, en 1996, se inició el estudio de la distribución de especies endémicas del país, habiendo definido las siguientes regiones como las de mayor endemismo florístico:

- Sierra de los Cuchumatanes
- Las Verapaces
- Cadena volcánica
- Sierra de las Minas y
- El Departamento de Izabal

El proyecto “Regiones de Mayor Endemismo Florístico de Guatemala” ha realizado viajes de colecta a los sitios reportados por la bibliografía y herbarios reportando presencia de especies endémicas en Las Verapaces (1997), Volcanes de Occidente (1998), Sierra de las Minas (2000-2001) e Izabal (2002-2003); todo esto con la finalidad de definir sitios de importancia para la conservación, y brindar esta información a entidades encargadas de decisiones en la creación y manejo de áreas protegidas en el país (23).

Dentro de las regiones visitadas con mayor endemismo en el país, una de las más cercanas y accesibles a la ciudad de Guatemala es el Biotopo para la Conservación del Quetzal, área que maneja el Centro de Estudios

Conservacionistas; razón por la cual, para este estudio se eligió como sitio de colecta; se realizó una colecta de muestras de plantas el día 27 de febrero 2001, colectándose varias Piperaceas y una Rubiaceae; de todas ellas cuatro resultaron ser endémicas; únicamente de la Rubiaceae sobrevivieron muestras, razón por la cual se decidió trabajar con ella.

## **2 Obtención de muestras de plantas endémicas**

En el Biotopo para la conservación del Quetzal Mario Dary Rivera, se obtuvieron muestras de plantas con raíz de la especie *Hoffmania sessilifolia* L., las que estaban ubicadas a 15°12'40.5" Latitud Norte y 90°13'00" Longitud Oeste, a 1,635 msnm; se trasladaron al Centro de Estudios Conservacionistas donde se determinaron taxonómicamente.

## **3 Tratamiento de muestras**

Luego de ser colectadas e identificadas taxonómicamente las muestras de *Hoffmania sessilifolia* L., se sembraron en macetas conteniendo una mezcla de  $\frac{3}{4}$  de tierra abonada y  $\frac{1}{4}$  de arena previamente desinfectada con agua hirviendo.

Las plantas se colocaron en el invernadero del Jardín Botánico del Centro de Estudios Conservacionistas –CECON- donde se trataron dos veces por semana con el funguicida Derosal 50 SC (metil-2-benzimidazol-carbamato 600 mg/l) (2.5 ml/l) y con Agrimycin-16,5 WP (estreptomycina 15%, terramicina (oxitetraciclina) 1.5%) (500 mg/l), desde el momento en que se sembraron.

Posteriormente se trasladaron al invernadero del Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas –ICTA- donde se continuó con la fumigación de las mismas y se realizó el estudio.

## **4 Esterilización de cristalería, soluciones y medios de cultivo**

Los frascos de compota y tubos de cultivo utilizados, las diferentes soluciones y los medios de cultivo se esterilizaron en el autoclave, durante 20 minutos a 121 grados centígrados y a una presión de 15 libras por pulgada cuadrada, previo a la siembra.

## **5 Determinación del medio más adecuado para el establecimiento de plántulas a partir de ápices.**

Debido a que en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.), se han observado problemas de oxidación y se ha utilizado con éxito polivinil pirrolidona -PVP- (antioxidante); se agregó este compuesto al medio de cultivo para el desarrollo de *Hoffmania*.

- Se preparó el medio Murashige y Skoog (MS) (7) utilizado para la reproducción *in vitro* del café *Coffea arabica* L., agregándole benomil (1000 mg/l), gentamicina (40 mg/l) y polivinil pirrolidona (PVP) (10,000 mg/l).

**MEDIO MURASHIGE Y SKOOG**

<b>Compuestos</b>	<b>mg/l</b>
<b>Macroelementos</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170

<b>Microelementos</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.8
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025

<b>Hierro</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8

<b>Inositol</b>	100
-----------------	-----

**Vitaminas** (500 ml) (para un litro se utilizan 10 ml de esta solución)

Tiamina HCl	20
Glicina	100
Acido nicotínico	25
Piridoxina HCl	25

<b>Sacarosa</b>	30 g/l
<b>Phytigel</b>	2 g/l
pH	5.7 – 5.8

Otro medio utilizado fue el medio WPM, en el cual, para preparar un litro, se mezcla lo siguiente:

**MEDIO WPM**

<b>Reactivo</b>	<b>mg/l</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	560
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	96
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	22

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.25
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990
NaEDTA	75
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	55
Tiamina HCl	0.4
Glicina	3
Acido nicotínico	0.4
Piridoxina HCl	0.4
Sacarosa	30,000
Agar-agar	7,000
Inositol	100
pH	5

### 5.1 Desinfección de las muestras

Los ápices se cortaron con la ayuda de tijeras y pinzas previamente autoclavadas, luego se desinfectaron siguiendo la siguiente metodología:

- Tres veces con jabón y se enjuagaron con agua de chorro,
- Se colocaron posteriormente en benomil (1000 mg/l) durante 20 minutos y se lavaron tres veces con agua destilada estéril.
- Se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.079% durante 30 minutos, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril.
- Por último, se colocaron en una solución de PVP (10,000 mg/l), durante 10 minutos y se trasladaron a la cámara de flujo laminar para su siembra.

### 5.2 Siembra de ápices

Utilizando la cámara de flujo laminar se procedió a la siembra de los ápices de *Hoffmania sessilifolia* L. en tubos de cultivo conteniendo medio Murashige y Skoog o Woody Plant Media, utilizando para ello técnicas de asepsia. Se colocó un ápice en cada uno de ellos.

### 5.3 Incubación

Ya sembrados los ápices en los tubos de cultivo se trasladaron al cuarto de incubación, donde se observaron diariamente para ver y anotar los cambios dados en el desarrollo de las plántulas. El cuarto de incubación se mantuvo con una temperatura de 25-28° C, una humedad relativa de 70 - 90% e iluminación de 2,000 lux.

### 5.4 Hipótesis

Al menos uno de los medios de cultivo utilizados facilita el desarrollo de ápices de *H. sessilifolia* L.

### **5.5 Variable de respuesta**

Número y porcentaje de ápices sin contaminación.

## **6 Evaluación de tres métodos de desinfección en el desarrollo de microestacas**

Se cortaron varias microestacas de *Hoffmania*, se desinfectaron utilizando tres diferentes métodos para así observar cual brindaba los mejores resultados. Las metodologías fueron las siguientes:

### **Método de desinfección I**

Lavado con agua y jabón.

Desinfección con benlate (1000 mg/l), 20 minutos.

Desinfección con alcohol (70%), un minuto.

Desinfección con hipoclorito de calcio (10%), durante 30 minutos, agregando dos gotas de tween 20 y luego se trasladó a la cámara de flujo laminar donde se hicieron tres lavados con agua destilada estéril y se procedió a la siembra en los tubos con medio de cultivo.

### **Método de desinfección II**

Lavado con agua y jabón.

Desinfección con benlate (1000 mg/l), durante 30 minutos.

Desinfección con hipoclorito de calcio al 10 % durante 30 minutos, agregándole dos gotas de tween 20 e introduciendo los recipientes con plántulas a la cámara de flujo laminar.

Se lavó tres veces con agua destilada estéril.

Desinfección con hipoclorito de calcio al 8% con dos gotas de tween 20, durante 20 minutos en la cámara de flujo laminar.

Se lavó tres veces con agua destilada estéril.

Se colocó en polivinil pirrolidona (PVP) (10,000 mg/l), durante 10 minutos.

Por último se lavó tres veces con agua destilada estéril.

### **Método de desinfección III**

Lavado con agua y jabón.

Desinfección con benlate ( 5000 mg/l), durante 20 minutos.

Se lavó con agua destilada estéril tres veces.

Se desinfectó con hipoclorito de sodio al 0.079 % + tween 20 durante 25 minutos.

Se hicieron tres lavados con agua destilada estéril.

Luego se lavó con polivinil pirrolidona (PVP) (10,000 mg/l) durante 10 minutos, se dejó en solución y se introdujo a la cámara de flujo laminar.

### **6.1 Hipótesis**

Al menos uno de los métodos de desinfección utilizados es efectivo en el desarrollo de plántulas de *H sessilifolia* L. sin contaminación.

## 6.2 Variables de respuesta

- Número de microestacas no contaminadas

## 7 Evaluación de cuatro concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo de microestacas:

El medio de cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog, con vitaminas en las concentraciones de Morel, y se le agregó 40,000 miligramos de sacarosa, benlate (1000 mg/l), gentamicina (40 mg/l) y cuatro concentraciones de BAP (10, 20, 30 y 40 mg/l); para observar las respuestas en el desarrollo de la planta (13).

Luego de una semana se transfirieron las microestacas a un medio similar sin gentamicina y sin benlate.

### Vitaminas de Morel para 1 litro de medio (7):

Inositol	100 mg
TiaminaHCl	1 mg
Acido nicotínico	1 mg
Piridoxina HCl	1 mg
Pantotenato de Ca	1 mg
Biotina	0.01 mg
Acido fólico	10 mg

## 7.1 Hipótesis

Al menos una de las concentraciones de bencilaminopurina –BAP- induce el desarrollo de brotes en microestacas de *H sessilifolia* L.

## 7.2 Variables de respuesta

- Número de microestacas no contaminadas
- Número de brotes desarrollados por microestaca en cada concentración de BAP.

## 8. Determinación del medio más adecuado para el establecimiento de plántulas a través de la siembra de microestacas.

Utilizando la cámara de flujo laminar se procedió a la siembra de microestacas de *Hoffmania sessilifolia* L. en tubos de ensayo conteniendo cuatro diferentes medios de cultivo:

Medio Murashige y Skoog (MS),

Medio WPM conteniendo 0.6 mg/l de 6-(y,y-dimethylallylamino)purina (2iP),

Medio WPM sin 2iP y

Medio T1 conteniendo 2,4-D (1 mg/l) y 2iP (0.5 mg/l).

Utilizando para ello técnicas de asepsia. Se colocaron microestacas en cada uno.

### **8.1 Desinfección de las muestras**

Las microestacas se cortaron con la ayuda de tijeras y pinzas previamente autoclavadas luego se desinfectaron de la manera siguiente:

- Tres veces con jabón y se enjuagaron con agua de chorro.
- Se colocaron posteriormente en benomil (1000 mg/l) durante 20 minutos y se lavaron tres veces con agua destilada estéril.
- Se desinfectaron con alcohol al 70% durante un minuto.
- Luego se sumergieron en una solución de hipoclorito de calcio al 10% durante 30 minutos, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril, en la cámara de flujo laminar.

### **8.2 Incubación**

Los tubos con medio de cultivo ya sembrados se trasladaron al cuarto de incubación, donde se observaron cada día para ver y anotar los resultados que se obtuvieron en el desarrollo de las plántulas. El cuarto de incubación se mantuvo a una temperatura de 25-28° C, a una humedad relativa de 70 - 90% e iluminación de 2,000 lux.

### **8.3 Hipótesis**

Al menos uno de los medios utilizados facilita el desarrollo de microestacas de *H. sessilifolia* L.

### **8.4 Variable de respuesta**

- Número y porcentaje de microestacas sin contaminación.
- Número de nudos nuevos desarrollados.

## **9 Organogénesis Directa e Indirecta**

### **9.1 Organogénesis Directa**

Porciones de hoja de *Hoffmania sessilifolia* L. se sembraron en medio Yasuda (conteniendo 1 mg/l de BAP) (14) y en medio WPM conteniendo diferentes concentraciones de 6-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallylamino)purina (2iP) ( 0.5, 0.6, 1, 1.5, 3, 5, 10 y 15 mg/l); para la obtención de plántulas, dichos tubos de cultivo se colocaron bajo luz indirecta durante uno o dos meses mientras se desarrollaban las plántulas.

Para la siembra en medio WPM con diferentes concentraciones de 2iP se cortaron porciones de hoja de aproximadamente un centímetro cortando todo el borde de la

hoja y la nervadura central. Colocando el envés de la hoja hacia arriba, los frascos ya sembrados se colocaron en el cuarto de crecimiento bajo luz indirecta.

### 9.1.1 Hipótesis

Al menos uno de los medios empleados favorece el desarrollo de plántulas en porciones de hoja de *Hoffmania sessilifolia* L.

### 9.1.2 Variables de respuesta

- Número y porcentaje de hojas no contaminadas.
- Número de plántulas desarrolladas por segmento de hoja sembrado.
- Número y porcentaje de plántulas desarrolladas.

## 9.2 Organogénesis Indirecta

### 9.2.1 Obtención de Callo

El medio T1 ha sido utilizado con buenos resultados en la producción de callo a partir de secciones de hoja en café *Coffea arabica* L.; debido a la presencia en el medio de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallylamino)purina (2iP), por esa razón se empleó para tratar de obtener callo de *Hoffmania sessilifolia* L.; los medios utilizados contienen los siguientes componentes (2, 20):

	<b>Medio T1 (mg/l)</b>	<b>Modificación de T1 (mg/l)</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825	825
KNO <sub>3</sub>	800	800
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	220	220
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	185	185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85	85
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.1	3.1
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	8.4	8.4
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4.3	4.3
KI	0.42	0.4
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.13	0.13
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.013	0.013
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.013	0.013
Na <sub>2</sub> EDTA	18.65	18.65
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	13.9	13.9
Tiamina	10	10
Myoinositol	100	100
Acido nicotínico	1	1
Piridoxina HCl	1	1
Glicina	1	1
Extracto de malta	400	400
Caseína hidrolizada	100	100
AIB	1	-----

2iP	2	0.5
2,4-D	0.5	1
Sacarosa	30,000	30,000
Phytigel	3,000	3,000
pH	5.6	5.6

Luego de la siembra de porciones de hoja en estos medios, una parte de los frascos se dejó por un mes en completa oscuridad (12 frascos) y otra parte durante este mes se dejó bajo luz indirecta (13 frascos) para observar resultados.

### 9.2.2 Desarrollo de Plántulas

Posteriormente, luego de transcurrido un mes, los callos desarrollados se transfirieron al medio Yasuda, conteniendo 4 y 6 mg/l de BAP que son las concentraciones con mejores resultados reportados para el desarrollo de embriones en *Coffea arabica*; así como los reportados por otros medios para el desarrollo de embriones (2, 14, 20 y 21) (**anexo 1**).

Se sembró una porción de callo, de aproximadamente 0.5 cm, en los siguientes medios conteniendo diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento:

- ◆ 0.1 mg/l de ácido naftalenacético (ANA) y 0.42, 0.46, 0.5, 0.55 y 0.59 mg/l de zeatina (5 tubos de cada concentración).
- ◆ 0.05 mg/l de ácido naftalenacético (ANA) y 0.42, 0.46, 0.5, 0.55 y 0.59 mg/l de zeatina (5 tubos de cada concentración).
- ◆ 0.01 mg/l de ácido naftalenacético (ANA) y 9, 10, 10.8, 11.6 y 12.4 mg/l de kinetina (KIN) (5 tubos de cada concentración)
- ◆ 4 mg/l de 2,4-D y 8 mg/l de bencilaminopurina (BAP)(25 tubos)
- ◆ (9.8 mg/l KIN, 1 mg/l ANA y 1 mg/l de 2,4-D); (43 mg/l de KIN y 2.2 mg/l de 2,4-D); (79 mg/l de KIN y 80 mg/l de 2,4-D); (86 mg/l de KIN y 2.2 mg/l de 2,4-D) y (160 mg/l de KIN y 20 mg/l de 2,4-D) (5 tubos de cada combinación).
- ◆ 4 y 6 mg/l de bencilaminopurina (BAP)(14 tubos de cada concentración)

#### Medio Yasuda

Reactivo	mg/l
KNO <sub>3</sub>	800
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	220
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.1
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	8.4
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4.3
KI	0.42
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.13
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.013

CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.013
Na <sub>2</sub> EDTA	18.65
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	13.9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	425
Tiamina	10
Myoinositol	100
Piridoxina HCl	1
Acido nicotínico	1
BAP	4 y 6
Sacarosa	30,000
Phytigel	3,000
pH	5.6

### 9.2.3 Hipótesis

Al menos uno de los medios utilizados facilitan el desarrollo de callo y plántulas en *H. sessilifolia* L.

### 9.2.4 Variables de respuesta

- Número y porcentaje de hojas no contaminadas.
- Número de hojas que desarrollaron callo.
- Número y porcentaje de plántulas desarrolladas.

## 10 Otros experimentos realizados para obtener plántulas

### 10.1 Medio WPM conteniendo diferentes concentraciones de ANA y BAP

Con la finalidad de desarrollar plántulas por organogénesis indirecta se sembraron porciones de hoja, hoja completa y tallo en medio WPM conteniendo 2.5, 5, 10 y 20 mg/l de ANA y 2.5, 5, 10, y 20 mg/l de BAP, así:

**Cuadro 1. Número de tubos sembrados con porciones de hoja, hoja completa y tallo en diferentes concentraciones de ANA y BAP.**

BAP (mg/l) \ ANA(mg/l)	0	2.5	5	10	20
0		10 tubos	10 tubos	10 tubos	10 tubos
2.5	10 tubos	10 tubos			
5	10 tubos		10 tubos	10 tubos	10 tubos
10	10 tubos		10 tubos	10 tubos	10 tubos
20	10 tubos		10 tubos	10 tubos	10 tubos

### **10.1.1 Hipótesis**

Al menos una de las combinaciones de ANA y BAP favorece el desarrollo de plántulas en porciones de hoja, tallo y hoja completa de *Hoffmania sessilifolia* L.

### **10.1.2 Variables de respuesta**

- Número y porcentaje de porciones de hoja, tallo y hoja completa no contaminadas.
- Número y porcentaje de plántulas desarrolladas en cada porción de hoja, tallo y hoja completa sembradas.

### **10.2 Medio WPM conteniendo 1 mg/l de BAP y 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 y 0.1 mg/l de ANA**

Con la finalidad de propiciar el desarrollo de plántulas a partir del callo obtenido de porciones de hoja, tallo y hoja completa sembradas en diferentes concentraciones de ANA y BAP se sembraron porciones de callo de 0.5 cm en medio WPM conteniendo 1 mg/l de bencilaminopurina (BAP) y 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 y 0.1 mg/l de ácido naftalenacético (ANA).

Se sembraron también porciones de hoja, tallo y hoja completa en medio WPM conteniendo 1 mg/l de bencilaminopurina (BAP) y 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 y 0.1 mg/l de ácido naftalenacético (ANA); con la finalidad de inducir el desarrollo de plántulas.

### **10.2.1 Hipótesis**

Al menos una de las concentraciones de ANA en medio WPM conteniendo 1 mg/l de BAP favorece el desarrollo de plántulas de *Hoffmania sessilifolia* L. a partir de callo y de porciones de hoja, tallo u hojas completas.

### **10.2.2 Variables de respuesta**

- Número y porcentaje de callo no contaminado.
- Número de porciones de hoja, tallo y hoja completa no contaminados.
- Número y porcentaje de plántulas desarrolladas en cada porción de callo.
- Número y porcentaje de plántulas desarrolladas en cada porción de hoja, tallo u hoja completa.

### **10.3 Medio WPM conteniendo diferentes concentraciones de ácido absícico (ABA)**

Porciones de callo obtenidos de fragmentos de hoja y tallo sembrados en diferentes concentraciones de ANA y BAP fueron colocados en medio WPM

conteniendo 0.01, 0.05, 0.5, 0.8, 1 y 2 mg/l de ácido absícico (ABA) para tratar de inducir la formación de plántulas.

### **10.3.1 Hipótesis**

Al menos una de las concentraciones de ABA favorece el desarrollo de plántulas de *Hoffmania sessilifolia* L. a partir de callo.

### **10.3.2 Variables de respuesta**

- Número y porcentaje de callo no contaminado.
- Número y porcentaje de plántulas desarrolladas en cada porción de callo.

## **11. Aclimatación de plántulas obtenidas in vitro**

Plántulas obtenidas *in vitro* de la especie *Hoffmania sessilifolia* L. de aproximadamente cinco centímetros de altura fueron transferidas al invernadero del Laboratorio de Biotecnología y se sembraron en macetas plásticas conteniendo una mezcla de  $\frac{3}{4}$  de tierra abonada y  $\frac{1}{4}$  de arena previamente desinfectada. Las macetas se regaron dos veces por semana tratando de mantener la humedad necesaria.

## **VII RESULTADOS Y DISCUSION**

### **1. Determinación del medio más adecuado para el establecimiento de plántulas a partir de ápices.**

Se utilizaron los brotes que crecieron en la planta luego de fumigarla por un lapso de tres meses; se sembraron ápices en un medio MS con 200 mg/l de gentamicina y benomil (1,000 mg/l); los ocho ápices sembrados no se contaminaron, luego de una semana fueron trasladados a un medio sin gentamicina ni benomil; sin embargo, a los 51 días de sembrados no mostraban crecimiento. Mejores resultados se obtuvieron al utilizar una concentración de 80 mg/l de gentamicina; ya que luego de trasladarlos a un medio sin gentamicina y benomil se observó crecimiento de las plántulas sin contaminación.

Por aparte siete ápices fueron sembrados en medio WPM conteniendo 0.6 mg de 2iP los cuales no mostraron contaminación, sino más bien crecimiento, desarrollando un nudo por mes (1.5 a 2 cm), ramificaciones y raíces; se observó también presencia de callo en la parte inferior del tallo. La tasa de propagación en este medio es de dos plantas cada dos meses (en un año se obtendrían 64 plantas).

Las plántulas crecidas de estos ápices, luego de dos meses, fueron trasladadas a un nuevo medio WPM sin regulador de crecimiento (2iP) para su propagación, desarrollándose dos nudos en un mes (2.97 cm), además, de desarrollar raíces. En este medio la tasa de propagación mostrada es de dos plantas cada mes (en un año se obtendrían 4,096 plantas).

Luego de transcurrido un mes en medio WPM sin regulador de crecimiento (2iP) las plántulas crecieron como se resume en el cuadro dos:

**Cuadro 2. Crecimiento de plántulas provenientes de ápices en medio WPM sin regulador de crecimiento.**

Repetición	Crecimiento de plántula (cm)	Número de nudos nuevos	Distancia entre nudos (cm)	Ramificaciones	Presencia de Raíz
1	2.4	2	0.75	No	Si
2	3	2	2.0	No	Si
3	4.7	2	2.0	No	No
4	3.5	4	1.6	No	Si
5	3	3	1.50	No	Si
6	2.7	1	1.60	No	No
7	1.5	2	0.45	No	Si
Media	2.97	2.28	1.41	No	Si 71%

Se observó que era mejor sembrar un ápice por frasco, ya que al sembrar más de dos solamente una plántula se desarrollaba y las otras no crecían. Al utilizar el

medio WPM sin regulador del crecimiento (2iP) la propagación de plántulas era más rápida (figura 2a y b), respecto de la obtenida con el medio MS.

## **2. Evaluación de tres métodos de desinfección en el desarrollo de microestacas.**

De los tres métodos de desinfección utilizados en estacas el que mejor resultados proporcionó fue el que utilizó jabón desinfectante (tres veces), luego benlate (1,000 mg/l) por 20 minutos, alcohol al 70% (1 minuto); hipoclorito de calcio (10%) por 30 minutos y lavado con agua destilada estéril. Los dos últimos pasos se llevaron a cabo en la cámara de flujo laminar. Al utilizar este método no hubo contaminación de las estacas, mientras que al utilizar los otros dos métodos sí se observó un 10% de contaminación, además de quemaduras en las plantas causadas por el hipoclorito de sodio en uno de los métodos, y en el otro método por utilizar dos veces hipoclorito de calcio, en diferentes tiempos.

Se pudo observar que en ocasiones el uso de hipoclorito de sodio dañaba la planta. Por el contrario, no se observaron quemaduras cuando se utilizó hipoclorito de calcio además del uso del alcohol.

Se observó, también, que la presencia de hojas en las estacas permitía que la plántula creciera y sobreviviera; comparado con las estacas que únicamente poseían nudo y bases de hoja cortadas que no mostraron crecimiento.

## **3. Evaluación de cuatro concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo de microestacas:**

De las cuatro concentraciones de bencilaminopurina (BAP) utilizadas en el medio MS, la que mejor resultado proporcionó fue la que contenía 30 mg/l de BAP, ya que las plántulas crecieron tres centímetros desarrollando cinco ramificaciones con tres nudos cada una; los datos provienen de cinco plántulas, las otras cinco microestacas sembradas en este medio se mantuvieron igual que al momento de siembra. Mientras que a una concentración de 10 mg/l el promedio corresponde a ocho estacas sembradas las cuales crecieron 0.96 centímetros con cuatro ramificaciones cada una. A una concentración de 20 mg/l crecieron 1.4 centímetros desarrollando cuatro ramificaciones de un nudo cada una. No se observó una diferencia muy notoria entre las concentraciones de 10 y 20 mg/l de BAP (cuadro 3).



**Cuadro 3. Crecimiento de plántulas provenientes de microestacas en medio MS conteniendo 10, 20, 30 y 40 mg/l de BAP.**

BAP mg/l	Número de plántulas *	Crecimiento de plántula (cm)	Número de nudos nuevos	Distancia entre nudos	Número de ramificaciones
10	8	0.96	1.38	0.50	3.87
20	5	1.42	1.8	0.48	3.0
30	5	3.12	3.0	0.58	4.8
40	1	1	1	0.5	Ninguna

\* Para cada concentración de bencilaminopurina –BAP- se sembraron 10 tubos con microestacas de *Hoffmania sessilifolia* L., sin embargo, al final del experimento en algunas concentraciones hubo microestacas que no crecieron y desarrollaron un tono rojizo. Para la concentración de 40 mg/l nueve microestacas se oxidaron por lo que los datos corresponden únicamente a una microestaca.

No se observó contaminación en ninguno de los tubos sembrados. Se pudo observar que era mejor trabajar con las nuevas hojas que aparecían luego de fumigar la planta por dos ó tres meses en el invernadero con Derosal y Agrimycin.

#### **4 Determinación del medio más adecuado para el establecimiento de plántulas a través de la siembra de microestacas.**

El medio WPM conteniendo 0.6 mg/l de 6-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallylamino)purina (2iP) fue adecuado para la propagación de la plántula por microestacas; desarrollando un nudo por mes (1.5 a 2 cm).

En el medio WPM sin regulador de crecimiento (2iP) se observó un crecimiento más rápido de las plántulas; formando un nudo cada diez días. Se observó que cada nudo posee cuatro o más yemas que pueden desarrollar ramas; las plántulas también desarrollaron raíces (figura 3a, b,c y d).

Luego de transcurrido un mes en medio WPM sin regulador de crecimiento (2iP) las plántulas crecieron así como se resume en el cuadro cuatro:

**Cuadro 4. Crecimiento de plántulas provenientes de microestacas en medio WPM sin regulador de crecimiento.**

Repetición	Crecimiento de plántula (cm)	Número de nudos nuevos	Distancia entre nudos (cm)	Número de ramificaciones	Presencia de Raíz
1	1.5	2	0.5	2	Si
2	1.5	3	0.63	2	Si
3	2.3	2	1.25	2	Si
4	3	5	1.25	2	Si
5	3	4	1.38	1	Si
6	3	4	1.75	1	Si
7	2.4	2	1.50	2	Si
8	3	4	0.73	2	No
9	2.3	7	0.79	4	Si
10	1.7	2	0.65	2	No
Media	2.37	3.5	1.04	2	80%

Se observó que los ápices no desarrollaron ramificaciones mientras que al sembrar estacas estas sí desarrollaron de dos a cuatro ramificaciones por nudo.

Otras microestacas se sembraron en medio MS sin reguladores de crecimiento y luego de transcurridos dos meses el crecimiento se resume en el cuadro cinco:

**Cuadro 5. Crecimiento de plántulas provenientes de microestacas en medio MS sin regulador de crecimiento.**

Repetición	Crecimiento de plántula (cm)	Número de nudos nuevos	Distancia entre nudos	Número de ramificaciones	Desarrollo de raíz
1	9	7	1.25	2	Si
2	10	7	1.5	4	Si
3	8	6	1	Ninguna	Si
4	6	5	1.55	2	Si
5	6.5	6	1.35	3	No
6	6	6	1	2	No, solo callo
7	6.3	6	1.25	2	No, solo callo
8	5	5	0.85	2	No, solo callo
9	5.3	6	1	6	Si
10	6.5	7	1.05	No	Si
Media	6.86	6.1	1.18	2.87	60%

Se observa una diferencia entre utilizar medio WPM o medio MS. En el medio WPM el 80% de las plántulas produjeron raíces, mientras que en el medio MS sólo un 60%. En el medio WPM en un mes se produjeron 3.5 nudos y en el medio MS sólo tres. La tasa de propagación mostrada fue de 3.5 plantas cada mes para el medio WPM (en un año se obtendrían 3,379,220 plantas) y de tres plantas cada

mes para el medio MS (en un año se obtendrían 531,441 plantas)(figura 3a, b, c y d).

Algunas estacas (cuatro) se sembraron en medio T1 conteniendo 2,4-D (1 mg/l) y 2iP (0.5 mg/l). Las plántulas no se contaminaron pero luego de dos meses no habían desarrollado más que un nudo (1.5 cm), aunque sí desarrollaron raíces.

Resulta mejor la respuesta obtenida en medio WPM sin 2iP, por el rápido desarrollo de plántulas; ya que en este medio se obtuvo un mayor número de plántulas por mes (3.5).

## **5. Organogénesis Directa**

De 25 tubos sembrados con porciones de hoja en el medio de Yasuda conteniendo un mg/l de BAP, 15 presentaron contaminación por hongo y bacteria (60%), en los restantes 10 no hubo formación de plántulas. Las hojas en un principio mantuvieron su color; pero, posteriormente y en el final del proceso, presentaron un color café claro.

Se sembraron nuevamente 10 tubos conteniendo el medio de Yasuda con porciones de hoja. No presentaron contaminación alguna y luego de ocho meses no desarrollaron nada, las hojas se mantuvieron de un color café claro.

En un tercer experimento se sembraron 50 tubos con porciones de hoja. Al principio se observó la formación de algunas protuberancias en los bordes de las porciones de la hoja, pero éstas no crecieron; luego de seis meses no se observó ningún cambio.

En uno de los experimentos se utilizó agitador durante la desinfección y se observó que las hojas sufrían daño y luego de un tiempo en el medio se tornaron amarillentas. Debido a que las hojas de esta especie no son coriáceas no se recomienda el uso de agitador durante la desinfección.

Las porciones de hoja sembradas en medio WPM, conteniendo 0.6 mg/l de 2iP, mostraron luego de cuatro meses de sembradas formación de protuberancias alrededor de la hoja, sin desarrollo de plántulas.

Para el medio WPM conteniendo 0.5, 1, 1.5, 3, 5, 10 y 15 mg/l de 2iP se utilizaron porciones de hoja de las plántulas crecidas *in vitro*. En las diferentes concentraciones de 2iP las porciones de hoja formaron protuberancias alrededor de las mismas pero no desarrollaron plántulas y luego de transcurridos tres meses las hojas se tornaron amarillas y cafés (figuras 4a y b), medio WPM con 0.5 mg/l de 2iP; se observa el callo formado en los bordes de las hojas y como posteriormente se tornan cafés).



No se obtuvo contaminación en las porciones de hoja sembradas en las diferentes concentraciones de 2iP.

## **6. Organogénesis Indirecta**

### **6.1 Obtención de Callo**

Se sembraron porciones de hoja en medio T1 conteniendo un mg/l de ácido (2,4-diclorofenoxi)-acético (2,4-D) y 0.5 mg/l de 6-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallylamino)purina (2iP).

De 25 tubos sembrados 12 se colocaron en completa oscuridad y 13 en un cuarto de crecimiento con luz indirecta. Ninguno se contaminó. En el transcurso de un mes se desarrolló callo en los bordes de todas las porciones de las hojas. En los tubos que estuvieron en oscuridad, el callo se desarrolló más que en los tubos que mantuvieron luz indirecta.

Con fines de propagar el callo, porciones de callo, de aproximadamente 0.5 cm, se trasladaron a dos medios diferentes, uno conteniendo un mg/l de 2,4-D y otro sin 2,4-D. Se sembraron un total de 48 tubos, 24 en cada medio. Doce tubos de cada medio se colocaron en oscuridad y 12 en luz indirecta.

Se observó que el mayor desarrollo de callo requería la presencia de 2,4-D y que el desarrollo era mejor en oscuridad que bajo luz indirecta. Ya que en ellos ya no se observaba porciones de hoja sino únicamente callo. En algunos tubos que no contenían 2,4-D, en luz indirecta, se observó que el callo era de color verde (figura 5a y b).

El callo se propagó entonces en medio T1 conteniendo un mg/l de 2,4-D en oscuridad hasta obtener aproximadamente 100 tubos con callo, los cuales se sembraron posteriormente en diferentes medios con reguladores del crecimiento para tratar de obtener plántulas.

Otro medio utilizado para el desarrollo de callo contenía 0.5 mg/l de 2,4-D, dos mg/l de 2-iP y un mg/l de AIB. Se desarrolló callo pero fue luego de transcurridos dos meses, a diferencia del medio que contiene un mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de 2iP donde se desarrolla callo en un mes.

### **6.2 Obtención de Plántulas**

El callo obtenido por propagación se sembró en diferentes medios conteniendo diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento, las cuales habían sido reportados con éxito en la obtención de embriones en diferentes especies de café (*Coffea* sp) (**anexo 1**).



En todos los medios utilizados se observó que el callo detuvo su crecimiento. En el medio que contenía 2,4-D y bencilaminopurina (BAP) se oscureció el callo mientras que en los otros se mantuvo de color blanquecino. Luego de transcurridos cinco meses, los medios de cultivo fueron renovados en las mismas concentraciones y se trasladaron las porciones de callo sembradas. Pasados cuatro meses más no se observaron en ninguno de estos experimentos formación de plántulas.

A pesar de que las combinaciones de reguladores del crecimiento utilizadas habían sido reportadas con buenos resultados en la obtención de embriones en café (*Coffea arabica*), en *Hoffmania sessilifolia* L., no se observó desarrollo de embriones ni plántulas. Probablemente se deban efectuar otros experimentos con concentraciones de reguladores de crecimiento cercanas a las reportadas.

## 7 Otros Experimentos realizados para obtener plántulas

### 7.1 Medio WPM conteniendo diferentes concentraciones de ANA y BAP

Luego de transcurridos 23 días en este medio, las porciones de hoja, tallo y hoja completa sembradas en las diferentes concentraciones de regulador de crecimiento desarrollaron callo, en algunos callos se observaba coloración roja y blanca, probablemente debido a la presencia de antocianinas en la planta (figuras 6a y b). Los resultados se resumen en el cuadro seis:

**Cuadro 6. Número de explantes que desarrollaron callo en las diferentes concentraciones de ANA y BAP utilizadas.**

BAP (mg/l) \ ANA (mg/l)	0	2.5	5	10	20
0		Hoja con coloración roja	No formaron callo	No se formó callo	No se formó callo, explantes de color oscuro.
2.5	10 tubos con callo *****	10 tubos con callo *			
5	10 tubos con callo *****		10 tubos con callo **	2 contaminados 8 con callo	10 tubos con callo
10	10 tubos con callo		10 tubos con callo *****	1 contaminada, 9 con callo ***	3 porciones oscuras, 7 con callo
20	10 tubos con callo.		10 tubos con callo	2 porciones oscuras, 8 con callo ****	8 oscuras, 2 hojas con callo

No se observó formación de callo en los tubos que contenían únicamente BAP; sí se formó callo en los tubos que contenían sólo ANA y las diferentes combinaciones de ANA y BAP. En los explantes sembrados a concentraciones de 20 mg/l de ANA y 10 y 20 mg/de BAP se observó oxidación.

Luego de permanecer de uno a tres meses los callos en las diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento (ANA y BAP), se observó la formación de plántulas en la mayoría de los tubos, de la siguiente forma:

\* (2.5 mg/l BAP y 2.5 mg/l ANA) En uno de los tubos creció una plántula a partir del callo de color blanco observado en la parte de abajo en contacto con el medio, respecto del callo rojo observado en la parte superior, en el transcurso de un mes y medio. En otro tubo con las mismas concentraciones de reguladores de crecimiento se desarrolló una plántula a partir del callo formado en la base de la hoja completa luego de transcurridos tres meses (figuras 7a y b).

\*\* (5 mg/l BAP y 5 mg/l ANA) En dos tubos se observó la formación de plántulas a partir del callo formado bajo estas concentraciones, luego de transcurridos tres meses (figura 8).

\*\*\* (10 mg/l BAP y 10 mg/l ANA) Se formó una plántula a partir del callo luego de transcurridos dos meses (figura 9).

\*\*\*\* (10 mg/l BAP y 20 mg/l ANA) Se formó una plántula a partir del callo formado en la base de una hoja completa, al transcurrir tres meses en el medio de cultivo (figura 10).

\*\*\*\*\* (2.5 mg/l ANA) Una plántula creció a partir del callo formado en la base de una hoja completa, luego de estar tres meses en un tubo con estas concentraciones de regulador del crecimiento (figura 11).

\*\*\*\*\* (5 mg/l ANA) Dos plántulas se formaron a partir del callo formado en el explante y una plántula se formó en otro tubo a partir del callo formado en la base de una hoja completa sembrada, luego de transcurrido un mes (figura 12a y b).

\*\*\*\*\* (5 mg/l BAP y 10 mg/l ANA) Se formó una plántula a partir del callo luego de transcurridos dos meses (figura 13).

**Cuadro 7. Número de explantes que desarrollaron plántulas en las diferentes concentraciones de ANA y BAP utilizadas.**

BAP (mg/l) \ ANA (mg/l)	0	2.5	5	10	20
0					
2.5	1	2			
5	3		2		
10			1	1	
20				1	

Aunque en cada combinación se sembraron diez tubos, se observó que la concentración de cinco mg/l de ANA produjo un mayor número de plántulas respecto de las otras combinaciones de ANA y BAP estudiadas; mientras que la mitad de la concentración de ANA o sea 2.5 mg/l produjo sólo una plántula. También se observa que concentraciones de 2.5 mg/l de ANA y BAP ó 5 mg/l de ANA y BAP produjeron dos plántulas.

## **7.2 Medio WPM conteniendo 1 mg/l de BAP y 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 y 0.1 mg/l de ANA**

### **7.2.1 Callo**

Luego de transcurrido mes y medio se observó la formación de 2 plántulas, una a partir del tallo y otra a partir de una porción de hoja rodeados de callo. El tubo contenía 1 mg/l de BAP y 0.07 mg/l de ANA. Estas plántulas se formaron por organogénesis directa (figura 14a).

Otras dos plántulas se formaron a partir del callo en los tubos que contenían 1 mg/l de BAP y 0.07 mg/l de ANA. Estas plántulas se formaron por organogénesis indirecta (figura 14b).

Una concentración de 1 mg/l de BAP y 0.07 mg/l de ANA favoreció la formación de cuatro plántulas; dos por organogénesis directa y dos por organogénesis indirecta, lo que corresponde al 40% de los tubos sembrados.

### **7.2.2 Porciones de hoja, tallo u hoja completa**

Luego de transcurrido un mes se observó la formación de una plántula a partir del callo formado en la base de la hoja completa, en dos tubos que contenían un mg/l de BAP y 0.07 mg/l de ANA. Otra plántula se formó también a partir del callo formado en la base de la hoja, en el tubo que contenía un mg/l de BAP y 0.075 mg/l de ANA (figura 15).

Se observa que la base de las hojas desarrolla callo en presencia de concentraciones adecuadas de reguladores del crecimiento, en este caso un mg/l de BAP y 0.07 mg/l de ANA. De este callo se obtuvo la formación de tres plántulas (30% de los explantes sembrados).









### **7.3 Medio WPM conteniendo diferentes concentraciones de ácido absícico (ABA)**

No se observó desarrollo de embriones en ninguna de las diferentes concentraciones de ABA utilizadas.

Se observó la formación de plántulas a partir de una porción de hoja rodeada de callo, una en un tubo que contenía 2.5 mg/l de ácido absícico (ABA), luego de transcurridos quince días en el medio; y otra en un tubo que contenía 5 mg/l de ácido absícico (ABA), a los treinta días de haber sido sembrado en el mismo (figura 16a y b).

Aunque el ácido absícico es reportado de utilidad en la formación de embriones, en la especie estudiada no se observó el desarrollo de los mismos. Sin embargo se formaron plántulas por organogénesis directa en dos diferentes concentraciones de ABA (2.5 y 5 mg/l) a los quince y treinta días respectivamente.

Considerando todos los experimentos realizados, la propagación por microestacas en medio WPM sin reguladores del crecimiento resulta ser la vía más rápida para la propagación de *H. sessilifolia* L., ya que en un mes se estarían obteniendo 3.5 plantas, de cada microestaca sembrada; respecto del medio MS sin reguladores del crecimiento donde se obtendrían tres plantas por mes.

Para la obtención de plántulas por organogénesis indirecta se necesitan dos meses pero el porcentaje máximo de plántulas obtenido fue del 30%, en un medio que contiene cinco mg/l de ANA, y 40% para un medio conteniendo un mg/l de BAP y 0.07 mg/l de ANA.

La obtención de plántulas por organogénesis indirecta lleva consigo la formación de callo, propagación del callo y posteriormente el desarrollo de plántulas a partir del callo; lo que implica un tiempo mayor de un mes, pues el callo se desarrolló en un mes en medio T1 conteniendo un mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de 2iP; la propagación del callo implicaría otro mes y un último mes para el desarrollo de plantas a partir del callo.

## **8. Aclimatación de plántulas obtenidas in vitro:**

De 20 plántulas de aproximadamente cinco centímetros de altura sembradas en macetas y trasladadas al invernadero únicamente dos plantas murieron, las otras 18 sobrevivieron y se adaptaron a las condiciones climáticas del invernadero diferentes de las condiciones existentes en el biotopo del quetzal, lugar donde se colectó la especie.

Se obtuvo un 90% de sobrevivencia y adaptabilidad de la especie, por lo que puede utilizarse esta metodología.

## VIII CONCLUSIONES

Basados en los diferentes experimentos realizados para tratar de propagar *in vitro* la especie *Hoffmania sessilifolia* L. podemos concluir lo siguiente:

- ◆ El asperjar la planta con 2.5 ml/l de la solución Derosal 50 SC (metil-2benzimidazol-carbamato 600 mg/l) y 500 mg/l de Agrimycin 16,5 (estreptomina 15%, terramicina (oxitetraciclina)1.5%) en el invernadero y luego trabajar con los nuevos brotes de la planta redujo a cero la contaminación de los explantes utilizados.
- ◆ El medio de desinfección que mejor resultado produjo fue el que utilizó inicialmente jabón desinfectante (tres veces), benomil 1000 mg/l por 20 minutos, alcohol al 70% durante un minuto, hipoclorito de calcio al 10% durante 30 minutos y luego lavar con agua destilada estéril; los dos últimos pasos se llevaron a cabo en la cámara de flujo laminar. Debido a que redujo la contaminación y no produjo daños en los tejidos de la planta.
- ◆ Una concentración de 80 mg/l de gentamicina, no daña los ápices y microestacas; y permite su crecimiento sin contaminación, siempre que se mantengan únicamente durante una semana en el medio conteniendo gentamicina.
- ◆ El medio Murashige y Skoog (MS) conteniendo vitaminas en las concentraciones de Morel, con 30 mg/l de bencilaminopurina (BAP) produjo un mayor crecimiento de las plántulas y un mayor número de brotes en las microestacas sembradas en el mismo.
- ◆ El medio Woody Plant Media (WPM) sin regulador de crecimiento (2iP) mostró mejores resultados en la propagación de *Hoffmania sessilifolia* L. por microestacas con una tasa de propagación de 3.5 plantas por mes.
- ◆ El medio T1 conteniendo un mg/l de ácido (2,4-diclorofenoxi)-acético (2,4-D) y 0.5 mg/l de 6-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallylamino)purina (2iP), luego de un mes, produjo la formación de callo en segmentos de hoja.
- ◆ El medio T1 conteniendo un mg/l de ácido (2,4-diclorofenoxi)-acético (2,4-D) fue el mejor medio para la propagación de callo.
- ◆ El medio WPM conteniendo concentraciones de ANA (2.5, 5, 10 y 20 mg/l) y BAP (2.5, 5, 10 y 20 mg/l) induce la formación de callo en porciones de hoja y tallo, luego de transcurridos 23 días en el mismo.
- ◆ Una concentración de 5 mg/l de ANA en medio WPM produjo la mayor formación de plántulas por organogénesis indirecta (se obtuvieron tres plántulas de diez explantes sembrados).

- ◆ Concentraciones de 2.5 mg/l de ANA y 2.5 mg/l de BAP; así como 5 mg/l de ANA y 5 mg/l de BAP en medio WPM indujeron la formación de plántulas por organogénesis indirecta (dos plántulas de diez explantes sembrados en cada concentración).
- ◆ Una concentración de un mg/l de BAP y 0.07 mg/l de ANA en medio WPM indujeron la formación de plántulas por organogénesis directa, a partir de porciones de hoja y tallo rodeadas de callo.
- ◆ Una concentración de un mg/l de BAP y 0.07 ó 0.075 mg/l de ANA produjeron la formación de plántulas por organogénesis indirecta; a partir del callo formado en la base de hojas completas sembradas en dicho medio. Estas concentraciones fueron más efectivas en cuanto a que en un lapso de un mes se desarrolló la plántula.
- ◆ Una concentración de 2.5 mg/l y 5 mg/l de ácido absícico produjeron la formación de plántulas por organogénesis directa en porciones de hoja.

## **IX RECOMENDACIONES**

Considerando que en los diferentes experimentos llevados a cabo se logró propagar la especie por ápices y microestacas y que se obtuvo el desarrollo de callo y plántulas por organogénesis directa e indirecta, se recomienda para posteriores estudios a realizar en esta especie:

- ◆ Sembrar en diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) (0.5-3.0 mg/l) y bencilamino purina (BAP) (0.5-3.0 mg/l) callo de *Hoffmania sessilifolia* L. para procurar obtener desarrollo de embriones o plántulas.
- ◆ Sembrar en diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) (1.5-20 mg/l) y bencilamino purina (BAP) (2-5 mg/l) porciones de hoja y hojas enteras de *Hoffmania sessilifolia* L. para tratar de inducir la formación de embriones o plántulas.

## X **BIBLIOGRAFIA**

- 1) Abdelnour-Esquivel, A.; Escalant, J.V. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 36 pp.
- 2) Albarran R., J.G. 1999. Influencia de los factores químicos y físicos sobre la regeneración de embriones somáticos de *Coffea arabica* en biorreactor simplificado. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 100 pp.
- 3) Amador, D. 1999. Manual de Prácticas de Laboratorio. Curso de Técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales. Maestría en Biotecnología de Plantas. Facultad de Agronomía. 50 p.
- 4) Azurdia, C. 1997. Colección Nuclear, una alternativa para el manejo de colecciones de germoplasma: caso del zapote en Guatemala. En: Ciencia y Tecnología, Enero/Junio, No. 1, USAC.
- 5) Davis, S. 1986. Plants in Danger. What do we know? International Union of Conservation of Nature and Natural Resources, Switzerland.
- 6) Etienne, H. 2000. Micropropagación masal de híbridos F1 de *Coffea arabica* por embriogénesis somática en apoyo al programa regional de mejoramiento. CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- 7) George, E.F.; Puttock, D.JM.; George, H.J. 1987. Plant Culture Media. Vol. 1. Formulations and Uses. Exegetics Limited. Great Britain. 567 pp.
- 8) Guzman, N.; Berthouly, M. 1996 Multiplicación vegetativa de café (*Coffea spp*) por microestacas. En: Memoria I Simposio Nacional sobre cultivo de tejidos vegetales. ICTA. p 80- 86.
- 9) Guzman, N.; Berthouly, M. 1996 Reproducción asexual en el género *Coffea* mediante embriogénesis somática. En: Memoria I Simposio Nacional sobre cultivo de tejidos vegetales. ICTA. p 87-106.
- 10) International Plant Genetic Resources Institute –IPGRI-. 1997. *Ex situ* conservation technologies and strategies. Annual Report. 53 pp.
- 11) Lizárraga, R., et al. 1991. Cultivo de tejidos para la eliminación de patógenos. Guía de Investigación CIP 3. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 21 pp.
- 12) Macz M., O. E. 1995. Manual para la propagación de orquídeas *in vitro*. Universidad Rafael Landívar. Programa de fortalecimiento académico de las Sedes Regionales PROFASR. 59 pp.

- 13) Molina, A. R. 2002. ANACAFE. Depto. de Investigación en Café. Laboratorio de Cultivo de Tejidos. (Comunicación personal).
- 14) Molina, A.; Figueroa, A. 1996. Propagación por microestacas y por embriogenésis somática en el cultivo *in vitro* del café. En: I Simposio nacional sobre cultivo de tejidos vegetales. ICTA. p 97-102.
- 15) Montoya H., L.M. 1991. Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Agronomía. 77 pp.
- 16) Orellana A., R.E. 1998. Estudio etnobotánico de 7 comunidades de la Reserva de la Biósfera Sierra de las Minas, Guatemala, con énfasis en Plantas Medicinales. (Tesis Bióloga) 73 pp.
- 17) Orozco, C. 1996. Cultivo de tejidos; su aplicación en agricultura. En: Memoria I Simposio nacional sobre cultivo de tejidos vegetales. ICTA. 129 pp.
- 18) Peinado, M., D.G.; Aguirre A., G. 2003. Estudio etnobotánico de Plantas Medicinales en la Franja Transversal del Norte. ICTA-CINOR. 33 pp.
- 19) CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W.M. y Mroginski, L.A. (eds). Cali, Colombia, p xii, 970.
- 20) Sondahl, M.R.; Sharp, W.R. 1977. High Frequency Induction of Somatic Embryos in Cultured Leaf Explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 81 S. 395-408.
- 21) Sondahl, M.R. et al. 1987. Handbook of Plant Cell Culture; Coffe. Exegetics Limited. Inglaterra. P 565-590.
- 22) Standley, P.; Steyermark, J. 1958. Flora of Guatemala. Fieldiana Botany. 13 volúmenes.
- 23) Suchini, A.E., et al. 2000. Evaluación y Conocimiento del Patrimonio Florístico del país. Dirección General de Investigación -DIGI- de la Universidad de San Carlos de Guatemala -USAC-. 92 pp.
- 24) Weaver, R. J. 1976. Reguladores del Crecimiento de las Plantas en la Agricultura. Trillas. México. 622 pp.

***XI ANEXOS***

**ANEXO 1**

Medio utilizado para obtención de embriones en café (19).

Para un litro de solución se agrega al medio Murashige y Skoog (MS) los siguientes compuestos:

KNO <sub>3</sub>	20,000 mg
Sacarosa	2,000 mg
Tiamina	10 mg
Piridoxina HCl	1 mg
Acido nicotínico	1 mg
Phytigel	3,000 mg
Zeatina	0.42, 0.46, 0.5, 0.55 y 0.59 mg/l
Acido naftalenacético	0.05 y 0.1 mg/l

El medio en el cual se sembraron callos para la producción de embriones contenía el medio Murashige y Skoog más los siguientes compuestos por litro de solución:

KNO <sub>3</sub>	20,000 mg
Sacarosa	2,000 mg
Tiamina	10 mg
Myoinositol	0.1 mg
Piridoxina HCl	1 mg
Acido nicotínico	1 mg
Phytigel	3,000 mg
Kinetina	9.8, 43, 79, 86 y 160 mg/l
Acido naftalenacético	1, 0, 0, 0 y 0 mg/l
2,4-D	1, 2.2, 80, 2.2 y 20 mg/l

Medio para el desarrollo de embriones a partir de callo (20 )

El medio utilizado para el desarrollo de embriones a partir de callo contenía los compuestos del medio Murashige y Skoog (MS) y los siguientes compuestos por litro de solución:

KNO <sub>3</sub>	20,000 mg
Tiamina	3.3 mg
Cisteína	12.3 mg
Myoinositol	33 mg
Sacarosa	40,000 mg
Phytigel	3,000 mg
Kinetina	9, 10, 10.8, 11.6 y 12.4 mg/l
Acido naftalenacético	0.01 mg/l

Medio para la inducción de embriones según Amauri Molina (14 )

Los siguientes compuestos se agregaron al medio Murashige y Skoog (MS) para preparar un litro de solución:

KNO <sub>3</sub>	20,000 mg
Tiamina	20 mg
Caseína	200 mg
Myoinositol	200 mg
Cisteína	40 mg
Sulfato de adenina	60 mg
Glicina	20 mg
Sacarosa	30 mg
2,4-D	4 mg
Bencilaminopurina	8 mg
Gelrite	2,000 mg
pH	5.6

Medio Yasuda para obtención de embriones a partir de callo según Albarrán (2 )

Para un litro de solución se mezcló el medio Murashige y Skoog (MS) con lo siguiente:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	425 mg
Tiamina	10 mg
Myoinositol	100 mg
Piridoxina HCl	1 mg
Acido Nicotínico	1 mg
Bencilaminopurina	4 y 6 mg
Sacarosa	30,000 mg
Phytigel	3,000 mg
pH	5.6

Vo.Bo. MSc. Domingo Amador

Vo.Bo. MSc. Héctor Sagastume

Vo.Bo. MSc. Sergio Melgar

