



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**CONSERVACIÓN *IN VITRO* BAJO CONDICIONES
DE CRECIMIENTO LENTO Y ESTABILIDAD
GENÉTICA DE CRISANTEMO
(*Dendranthema grandiflorum* Kitam.)**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

PRESENTA:

MINERVA SILVIA MÁRQUEZ VILLAR

Chapingo, Estado de México, Diciembre de 2013



DIRECCION GENERAL ACADEMICA/
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

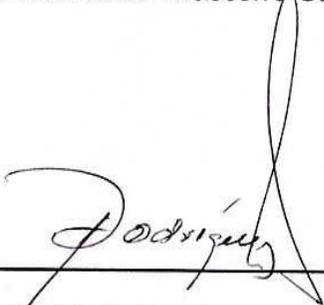


“Conservación *in vitro* bajo condiciones de crecimiento lento y estabilidad genética de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Kitam.)”, tesis realizada por la Biól. Minerva Silvia Márquez Villar, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

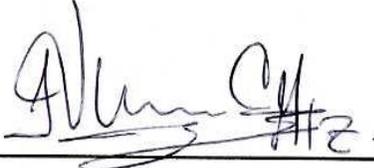
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR: 

Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESOR: 

Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR: 

Dr. Víctor Conde Martínez

DEDICATORIA

A Dios que me dio las herramientas, el tiempo y puso a las personas indicadas en mi camino para alcanza una meta más en mi vida.

A mis padres Silvia y Manuel y a mis hermanos Amira y Javier por su apoyo y amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Oscar Mascorro por su apoyo, confianza, instrucción y amistad que me ayudó a finalizar la maestría.

Al Dr. Víctor Conde y José Luis Rodríguez por aceptar formar parte de mi comité, por sus valiosas observaciones al trabajo.

A Antelmo Osorio por las sugerencias y apoyo técnico para este trabajo.

A mi amigo Alejandro Valdez Mondragón por ayudarme a conseguir los artículos para la tesis.

A Israel Vargas por tu amistad y disposición, por los consejos y edición del documento a pesar de la distancia y ocupaciones.

A mi amiga Willelmira por la revisión del Abstract.

A mis ami@s gracias por su aliento por acompañarme en este proceso.

A la Universidad Autónoma Chapingo por darme la oportunidad de continuar con mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de Maestría.

DATOS BIOGRÁFICOS

Esta tesis fue realizada por la Bióloga Minerva Silvia Márquez Villar originaria de México, Distrito Federal. Nació el 27 de Agosto de 1982.

Realizo sus estudios de licenciatura (2001-2004) En la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, obteniendo el título de Bióloga con la tesis titulada “Regeneración in vitro de *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* y valuación de su potencial como bioinsecticida contra *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz)”.

En enero de 2009 ingreso a la Maestría en el Programa de Biotecnología Agrícola del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Conservación *in vitro* bajo condiciones de crecimiento lento y estabilidad genética de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Kitam.)

In vitro conservation under slow-growth conditions and genetic stability of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitam.)

Minerva Silvia Márquez Villar¹, José Oscar Mascorro Gallardo²

RESUMEN

Se probaron diferentes condiciones para la conservación *in vitro* en crecimiento lento de plántulas de crisantemo. Los cultivos se incubaron en medio MS bajo dos temperaturas (4 °C y 25 °C) y dos azúcares-alcoholes (sorbitol y manitol) como fuentes de carbono. La reducción del crecimiento y 100 % de sobrevivencia de las plántulas durante 10 meses se logró al añadir 2 o 4% de sorbitol al medio de cultivo, con temperatura de 4 °C luz tenue fría y fotoperiodo 16/8 h (luz/obscuridad). Después del periodo de conservación las plantas se recuperaron y desarrollaron normalmente en medio MS sin hormonas, suplementado con 30g l⁻¹ de sacarosa. Al emplear manitol se obtuvieron plántulas de menor tamaño pero se redujo el porcentaje de sobrevivencia. A fin de determinar la estabilidad genética de las plántulas tras el tratamiento de conservación se realizó un análisis con la técnica de RAPDs, los resultados mostraron que no hubo diferencias genéticas entre la planta madre y las plántulas conservadas. El protocolo establecido en éste trabajo se empleó exitosamente en la conservación y posterior recuperación de dos líneas transgénicas de la variedad Indianápolis, de la variedad Hartmann y 12 líneas transgénicas derivadas de ésta.

Palabras clave: Conservación *in vitro*, crecimiento lento, RAPDs, *Dendranthema grandiflorum* Kitam., manitol, sorbitol.

ABSTRACT

Different conditions for *in vitro* conservation by slow growth for chrysanthemum plantlets were tested. Cultures were incubated on MS medium under two temperatures (4°C and 25 °C) and two sugar-alcohols (sorbitol and mannitol) as carbon sources. The slow growth and 100% survival of plantlets for 10 months were obtained with sorbitol at 2 or 4% at 4°C, with dim cold light and 16/4 h light/dark. After storage period plantlets were recovered and regrowth normally in MS medium without hormones, supplemented with 30 g l⁻¹ sucrose. By using mannitol smaller plantlets were obtained but the survival percentage decreased. In order to determine the plantlets genetic stability after the conservation treatment, analysis through the RAPDs technique took place. According to results, no genetic difference occurred between the mother plant and the preserved plantlets. The protocol established in this work was successful in storing and recovering of two transgenic lines of Indianapolis variety, Hartmann variety, as well as 12 transgenic lines derived from the latter.

Key words: *In vitro* conservation, slow growth, RAPDs, *Dendranthema grandiflorum* Kitam., mannitol, sorbitol.

¹Autor de la tesis, requisito para obtener el título de Maestro en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo. México.

²Profesor-investigador del Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 38.5 Carretera México- Texcoco. Chapingo, México

ÍNDICE

ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	2
2.1 Objetivo general	2
2.2 Objetivos particulares.....	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA	3
3.1 Generalidades del crisantemo	3
3.1.2 Origen.....	3
3.1.3 Características.....	3
3.1.4 Importancia.....	3
3.2 Conservación de germoplasma vegetal.....	4
3.2.1 Estrategias de conservación	5
3.2.2 Conservación <i>in vitro</i>	6
3.3 Conservación <i>in vitro</i> en crecimiento lento	7
3.3.1 Factores que influyen en el crecimiento lento	8
3.3.2 Modificación de las condiciones de incubación	8
3.3.2.1 Luz	8
3.3.3.2 Temperatura.....	9
3.3.3 Modificación del medio de cultivo.....	10
3.3.3.1 Concentración de minerales	11
3.3.3.2 Fuente de carbono	11
3.3.3.2.1 Sorbitol y Manitol	12
3.3.3.2.1.1 Metabolismo del manitol.....	12
3.3.3.2.1.2 Metabolismo del sorbitol.....	14
3.3.3.2.2 Manitol o Sorbitol como fuente de carbono <i>in vitro</i>	16

3.3.3.3 Agentes osmóticos	17
3.3.3.3.1 Manitol como agente osmótico.....	18
3.3.4 Variación genética en plantas conservadas <i>in vitro</i>	18
3.3.4.1 Indicadores o mediciones de variación génica	19
3.3.4.1.1. Marcadores Moleculares: RAPD	19
3.3.4.1.2 Base molecular de los RAPDs	20
3.3.4.1.3 Propiedades de los marcadores RAPD	20
IV MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.1 Material Vegetal	22
4.2 Procedimiento de conservación.....	22
4.2.1 Análisis estadístico	23
4.3 Estabilidad genética	23
4.3.1 Extracción de ADN.....	24
4.3.2 Obtención de los patrones RAPD	25
4.3.2.1 Mezcla de reacción de la PCR para la obtención de los patrones RAPDs	26
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
5.1 Conservación en crecimiento lento.....	27
5.1.1 Efecto de la Temperatura.....	27
5.1.2 Efecto del tipo de fuente de carbono.....	28
5.1.3 Efecto de la concentración de la fuente de carbono.....	30
5.1.4 Interacción de los factores	32
5.2 Estabilidad genética de las plántulas.....	35
5.2.1 Análisis con RAPDs	35
5.3 Ensayo de conservación de germoplasma de interés.....	37
VI CONCLUSIONES	39
VII PERSPECTIVAS.....	39
VIII BIBLIOGRAFIA	40

ÍNDICE DE TABLAS

Cuadro 1. Combinaciones de temperatura, tipo y concentración de fuente de carbono para la conservación <i>in vitro</i> en crecimiento lento.....	23
Cuadro 2. Reactivos empleados en la preparación de amortiguadores.	24
Cuadro 3. Iniciadores ROTH-B para generar marcadores RAPD.....	25
Cuadro 4. Efecto de la temperatura, tipo y concentración de azúcar en la altura , número de hojas y sobrevivencia de plántulas de crisantemo <i>in vitro</i> durante 10 meses en crecimiento lento.....	32
Cuadro 5. Número de bandas RAPDs detectadas por cada iniciador en muestras de ADN de plántulas conservadas por 10 meses en crecimiento lento.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntesis, transporte y catabolismo del manitol en las plantas.....	14
Figura 2. Síntesis, transporte y catabolismo del sorbitol en las plantas	15
Figura 3. Efecto de la temperatura 4 y 25°C en la altura de las plántulas y porcentaje de supervivencia.....	28
Figura 4 Efecto del tipo de fuente de carbono en el crecimiento y supervivencia de plántulas de crisantemo	30
Figura 5 Efecto de la concentración de la fuente de carbono en la altura de las plántulas y porcentaje de supervivencia	31
Figura 6. Conservación <i>in vitro</i> de crisantemo después de 10 meses bajo crecimiento mínimo.....	35
FIGURA 7. Patrón RAPD obtenidos en muestras de ADN de crisantemo con el iniciador ROTH-2, después de 10 meses de conservación en crecimiento lento. Marcador de peso molecular conocido (M; 1 kb Ladder, Fermentas ®). Carriles 1-10 tratamientos correspondientes; carril 11 como control muestra de una plántula <i>in vitro</i> en condiciones estándar de cultivo.....	37
Figura. 8 Plántulas de crisantemo recuperadas de tratamiento de conservación y cultivadas en medio de inducción de brotación. MS adicionado con AIA 1 mg·litro ⁻¹ , BAP 3 mg·litro ⁻¹ y sacarosa 30 g·litro ⁻¹ , incubados a 25±1 °C.....	38

I. INTRODUCCIÓN

El crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Kitam.) es una de las especies ornamentales de mayor importancia a escala mundial como flor de corte y para maceta. Ocupa el segundo lugar en importancia económica como cultivo florícola, solo por debajo de la rosa (Teixeira da Silva, 2004). En México el crisantemo ocupa el segundo lugar en demanda como especie ornamental, después de las rosas; en el año 2012 se cultivaron 2,466 has, que generaron ganancias por 1,068 millones de pesos (Anónimo, 2013).

A lo largo de los años se han creado, mediante mejoramiento genético numerosas variedades de crisantemo, mismas que resulta difícil mantener en campo, por lo que se requiere de métodos para su conservación y mantenimiento.

Los avances en biotecnología vegetal ofrecen nuevas opciones para la multiplicación y conservación del germoplasma vegetal. La conservación *in vitro* por crecimiento lento es una opción que representa ventajas para el mantenimiento a corto y mediano plazo de material vegetal de propagación vegetativa como el crisantemo. Permite almacenar un gran número y variedad de muestras en un área reducida, facilita el manejo de los cultivos al extender el número de subcultivos por varios meses incluso años y garantiza la sanidad de las muestras (Cruz-Cruz *et al.*, 2013).

Debido a que los métodos de propagación y/o conservación *in vitro* pueden generar alteraciones genéticas que modifican las características morfológicas, tasa de crecimiento, periodo de floración, productividad, entre otros, de los cultivos obtenidos con respecto al material inicial, resulta necesario realizar estudios de estabilidad genética. Los marcadores moleculares son una herramienta confiable para detectar y evaluar la variación somaclonal.

El presente trabajo tuvo como objetivo establecer un protocolo para la conservación *in vitro* de germoplasma de crisantemo por crecimiento lento, así como la evaluación de la estabilidad genética mediante RAPDs, de las plantas después del tratamiento de conservación.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Implementar un protocolo de crecimiento lento *in vitro* para la conservación del germoplasma de crisantemo

2.2 Objetivos particulares

- Determinar las condiciones óptimas de temperatura para crecimiento lento de las plantas de crisantemo.
- Determinar el mejor tipo y concentración de fuente de carbono para crecimiento lento de las plantas de crisantemo.
- Verificar la estabilidad genética por ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) de las plántulas recuperadas después del proceso de crecimiento lento.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Generalidades del crisantemo

3.1.2 Origen

El crisantemo, (*Dendranthema grandiflorum* Kitam.) es una planta originaria de Asia Oriental que pertenece a la familia Asteraceae, y probablemente se originó de híbridos entre especies tetraploides de *D. indicum* var. *Procumbens* (Lour.), nativo del Norte de China x una especie diploide *D. zawadskii* var. *Latilobum* (Maxim.), nativa de China Central, aunque el verdadero origen aún no está claro (Fukai et. al., 2000). El crisantemo que actualmente cultivan los floricultores es un híbrido complejo, y la mayoría de las especies de donde se han generado los nuevos cultivares son igualmente originarias de China (Fukai, 2003).

3.1.3 Características

Planta herbácea cuyas hojas pueden ser lobuladas o dentadas, ligulosas o rugosas, de color variable entre el verde claro y oscuro, recubiertas de un polvillo blanquecino que le da un aspecto grisáceo y casi siempre aromáticas. Lo que se conoce como flor, es realmente una inflorescencia en capitulo. Existen diversos tipos de capitulo cultivados comercialmente, aunque, en general, esta inflorescencia está formada por dos tipos de flores: femeninas (radiales; se corresponden con la hilera exterior en las margaritas) y hermafroditas (concéntricas; se corresponden con las centrales). El receptáculo es plano o convexo y está rodeado de una envoltura de brácteas (Fukai, 2003).

3.1.4 Importancia

El crisantemo es una de las especies ornamentales de mayor importancia a escala mundial como flor de corte y para maceta. Altamente apreciada por la gran diversidad de formas y colores de sus flores, ocupa el segundo lugar en importancia económica como cultivo florícola, solo por debajo de la rosa (Teixeira da Silva, 2004). Recientemente, se han descubierto otros usos, como

tener propiedades culinarias, medicinales y además, como un interesante etnofármaco (Teixeira da Silva, 2003)

En México el crisantemo ocupa el segundo lugar en producción como especie ornamental, después de las rosas; en el año 2010 se cultivaron 2,466 has, que generaron ganancias por 1,068 millones de pesos. El principal productor fue el Estado de México (Anónimo, 2013).

Las necesidades en el mercado de ornamentales cambian a menudo y rápidamente, en función de la moda. Nuevas variedades se introducen en los mercados, y las variedades antiguas suelen desaparecer rápidamente, aunque éstas pueden volver a ponerse de moda. El mejoramiento genético del crisantemo ha llevado a la generación de muchas variedades, mismas que resulta difícil mantener en campo. Adicionalmente las semillas de crisantemo son altamente heterocigóticas, por lo que no son la mejor forma de conservación para líneas ornamentales (Teixeira da Silva, 2004).

Por tanto, un método de conservación *in vitro* podría ser una herramienta importante tanto para los productores como para los mejoradores para responder rápidamente a las cambiantes demandas del mercado y concentrar el mayor número de accesiones posibles en poco espacio y a bajo costo.

3.2 Conservación de germoplasma vegetal

La conservación de germoplasma vegetal es de fundamental importancia ya que éste representa la fuente primaria de variabilidad genética para el mejoramiento de cultivos alimentarios u ornamentales.

Las plantas ornamentales han sido cultivadas por miles de años; hay evidencias del cultivo en pinturas egipcias que datan del 1500 A. C. y fueron adquiriendo mayor importancia a lo largo de la historia; a partir del siglo XIX los jardines con flores son parte importante en la planeación de una ciudad. Como resultado de una intensa actividad de mejoramiento a lo largo del tiempo, se han generado miles de nuevas opciones vegetales para la arquitectura de paisaje y decoración de interiores, lo que representa una gran cantidad de germoplasma

disponible en la actualidad. A pesar de esto hay pocos protocolos para conservar y proteger los recursos genéticos de las plantas ornamentales (Ozudogru *et al.*, 2010).

3.2.1 Estrategias de conservación

Existen dos estrategias básicas para la conservación de germoplasma vegetal, la conservación *in situ* y la conservación *ex situ*.

La conservación *in situ* se refiere a la conservación de los ecosistemas y hábitats naturales y al mantenimiento y recuperación de poblaciones viables de especies, tanto silvestres como cultivadas o domesticadas, en los alrededores en donde hayan desarrollado sus propiedades distintivas (Engelmann y González-Arno 2013; Rao, 2004). Generalmente mediante la creación en parques nacionales, reservas biológicas y reservas ecológicas (García *et al.*, 2007)

La conservación *ex situ* se entiende como la conservación de los componentes de la diversidad biológica fuera de su hábitat natural, en bancos de semilla, bancos de germoplasma en campo o *in vitro* y jardines botánicos, actualmente los bancos de polen y ADN son otras opciones de conservación (Rao, 2004). Estas estrategias son particularmente apropiadas para especies cultivadas y sus parientes silvestres, así como para los productos biotecnológicos que resultan de los programas de hibridación somática e ingeniería genética (Engelmann y González-Arno, 2013).

Los bancos de semillas son la forma más común de conservar el germoplasma vegetal por largos periodos. Sin embargo, hay especies vegetales para las cuales la conservación como semilla resulta poco adecuada, encontramos las que producen semillas de comportamiento no ortodoxo, las que se propagan vegetativamente, los genotipos estériles y las que producen semilla pero éstas son altamente heterocigóticas y no representan el perfil genético de la planta madre que se desea conservar, como puede ocurrir con cultivares muy

antiguos, líneas vegetales obtenidas por hibridación somática o líneas vegetales modificadas genéticamente.

Para este tipo de material se prefiere la propagación clonal (Engelmann y González-Arno, 2013; Ozudogru *et al.*, 2010; Rao, 2004).

Para la conservación del germoplasma clonal, el banco de germoplasma en campo ha sido el método de conservación *ex situ* más utilizado. Sin embargo existen ciertos inconvenientes. Los recursos genéticos están expuestos a plagas, enfermedades, sequía, daños climatológicos y errores humanos; no se encuentran en condición propicia para el intercambio de germoplasma, debido a los riesgos de transmisión de enfermedades a través del intercambio de material vegetativo. Adicionalmente, tiene un alto costo de mantenimiento, se requieren el uso de grandes extensiones de tierra y son muy laboriosos (Engelmann y González-Arno, 2013; Rao, 2004).

A la luz de los problemas antes descritos se han buscado estrategias alternativas de conservación, en ésta área, la biotecnología provee herramientas para la conservación *in vitro* a través de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, con las cuales es posible conservar, plantas completas, meristemos, semillas, embriones somáticos, embriones cigóticos, hojas, tallos, raíces, yemas, polen, anteras, callos o protoplastos.

3.2.2 Conservación *in vitro*

La conservación *in vitro* constituye parte esencial de la estrategia general de conservación e intercambio de recursos genéticos en todo el mundo. Entre otras ventajas, permiten la propagación clonal del material en poco tiempo, en ambientes asépticos y controlados, lo cual hace posible obtener plantas libres de virus, (Engelmann, 2000; Rao, 2004). Adicionalmente La “miniaturización” de los explantes *in vitro* permite reducir los requerimientos de espacio y algunos costos en mano de obra (Engelmann y González-Arno, 2013).

Sin embargo, las altas tasas de multiplicación que se alcanzan con el cultivo *in vitro*, ocasiona dificultades en el manejo y almacenamiento de grandes

colecciones de germoplasma; principalmente porque deben hacerse subcultivos del material vegetal en medio fresco de manera frecuente (Engelmann y González-Arno, 2013). Esto significa un riesgo potencial de pérdidas por contaminación y más importante aún, de que se pierda la integridad genética del material debido a la variación somaclonal que se induce cuando se practica el cultivo de tejidos por periodos prolongados (Scowcroft, 1984). Por consiguiente, se hizo necesario implementar procedimientos *in vitro* que permitieran extender los intervalos de subcultivo.

Las dos estrategias que han permitido, hasta ahora, alcanzarlo son la crioconservación y las técnicas de crecimiento lento.

Dichas estrategias se emplean en función del tiempo de almacenaje requerido: i) Técnica de crecimiento lento, donde el germoplasma se almacena como tejidos o plántulas en condiciones estériles a corto y mediano plazo, el objetivo es reducir el crecimiento de los explantes e incrementar los intervalos entre los subcultivos; ii) Crioconservación, técnica que se emplea para almacenaje a largo plazo, manteniendo el material a temperaturas ultrabajas, generalmente inmerso totalmente en nitrógeno líquido (-196 °C).

Con ésta técnica, la actividad metabólica y la división celular del material se detiene por completo. (García, *et al.*, 2007; Rao, 2004).

3.3 Conservación *in vitro* en crecimiento lento

Las técnicas de crecimiento lento son una opción para el almacenaje a corto y mediano plazo, Tiene como punto de partida un buen protocolo de cultivo *in vitro*, al cual se le hacen modificaciones, para ocasionar la disminución del crecimiento y el metabolismo de la planta y así extender el periodo de cultivo, al reducir la frecuencia de transferencias de las plantas a medio fresco (Mijangos-Cortés, 2010; Roca *et al.*, 1994; Withers, 1991).

Esta técnica ha sido utilizada para la conservación de germoplasma de especies como, de caña de azúcar (*Saccharum sp.*) (Taylor y Dukin, 1993); yuca (Roca *et al.*, 1994); papa (Toledo y Golmirzaie, 1998); papaya (Acosta y

Gracia, 2005); boniato (*Ipomoea batatas*) (Espinosa *et al.*, 2002); *Deutzia scabra* Thunb. (Gabr, y Sawsan-Sayed, 2010). *Musa spp.*, *Allium spp.*, cassava, papa, papa dulce y árboles de clima templado (Rao, 2004).

3.3.1 Factores que influyen en el crecimiento lento

Para reducir la tasa de crecimiento de las plantas *in vitro* se pueden alterar las condiciones óptimas de cultivo mediante: 1) la manipulación de la composición del medio de cultivo; 2) la modificación de las condiciones de incubación; y 3) una combinación de ambas. La primera implica la adición de sustancias químicas, como, reguladores que retardan el crecimiento, compuestos osmoreguladores y modificación en la concentración de vitaminas, minerales y fuente de carbono en el medio de cultivo. La segunda comprende, principalmente el empleo de bajas temperaturas y baja intensidad lumínica (Engelmann, 1998).

Factores, como el tamaño de los tubos de ensayo o de los frascos, la calidad y concentración del agente gelificante, la adición de carbón activado al medio, la limitación de la oxigenación, duración del fotoperiodo, entre otros, son también importantes en el control del crecimiento (Roca *et al.* 1991).

3.3.2 Modificación de las condiciones de incubación

3.3.2.1 Luz

El crecimiento y desarrollo de las plantas es dependiente de la luz para, la fotomorfogénesis (desarrollo de estructuras vegetativas inducido por la luz). En la mayoría del material vegetal *in vitro* la tasa fotosintética es baja por lo que los cultivos dependen principalmente de una fuente externa de sacarosa u otro azúcar metabolizable. Por lo tanto la luz es importante por su efecto en la fotomorfogénesis (George y Sherrington, 1984).

El comportamiento de muchos cultivos depende de la calidad, intensidad y fotoperiodo de la luz que reciben, dado que varias enzimas involucradas en el desarrollo y en el metabolismo secundario son influenciadas por la luz.

La mayoría de los cultivos desarrollan a una intensidad luminosa entre 1000 a 5000 lux (Marín, 1993). Entre otras cosas la intensidad de la luz regula el tamaño de las hojas y los tallos, así como su vía de morfogénesis, y está involucrada en la formación de pigmentos y en la hiperhidratación (Moreira da Silva and Debergh, 1997).

La calidad de la luz puede determinar diferentes respuestas morfogénicas, como elongación de la planta, brotación axilar, morfología y tamaño de la hoja. En general se utiliza luz blanca, pobre en longitudes de onda larga (Marín, 1993).

El fotoperíodo habitualmente utilizado es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, aunque algunos cultivos requieren oscuridad (Marín, 1993).

Pruski *et al.* (2000) reporta que al reducir la intensidad de la luz a $3\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mejoró la calidad de los cultivos de papa conservados por casi 6 semanas bajo 4°C (Pruski *et al.*, 2000)

3.3.3.2 Temperatura

El crecimiento de las plantas es notablemente sensible a la temperatura. A veces, un cambio en pocos grados da lugar a un cambio significativo en la tasa de crecimiento. Cada especie o variedad posee, en cualquier etapa de su ciclo de vida y para cualquier conjunto de condiciones, una temperatura mínima por debajo de la cual no crece, una temperatura óptima (o rango de temperaturas) a la cual crece a máxima velocidad y una temperatura máxima por encima de la cual no crece e incluso puede morir (Salisbury y Ross, 1994).

La reducción de la temperatura ha sido el recurso más generalizado para disminuir la actividad metabólica y, en consecuencia, el crecimiento de los cultivos. Las especies tolerantes a frío suelen mantenerse en un rango de temperatura de 4°C a 10°C , mientras que para las especies tropicales puede

requerirse temperaturas más altas entre 10°C y 25°C (Keller *et al.* 2006). Es muy importante determinar la temperatura apropiada para cada especie a fin de evitar congelación y/o daños en el material conservado.

La baja temperatura ente 0°C y 15° C en plantas de clima templado, es uno de los factores más importantes que limita el crecimiento vegetal.

Como resultado a la exposición a bajas temperaturas ocurre una serie de cambios estructurales y metabólicos en la planta. Por mencionar algunos, la estructura y composición lipídica de la membrana celular se modifica haciéndola más rígida e induciendo rearrreglos en el citoesqueleto, también la membrana de los plastidios y tilacoides sufre cambios ultraestructurales y aumenta la densidad del citoplasma (Huják y Salak, 2010). En el metabolismo se reduce la síntesis de proteínas y la actividad enzimática; baja la tasa de respiración celular, interfiriendo con el metabolismo de la glucosa y la producción de ATP y el transporte de los carbohidratos se hace más lento, (Krasensky y Jonak, 2012; Taiz, 2000; Theocharis *et al.*, 2012).

El control de la temperatura combinado con la disminución de la intensidad de la luz es otra de las formas más utilizados para lograr un crecimiento reducido de los cultivos *in vitro* (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010).

Lolium multiflorum Lam. fue conservada *in vitro* bajo temperaturas de 2-4°C haciendo subcultivos cada año (Dale, 1980). Aynalem y colaboradores (2002) reportan la conservación *in vitro* de una amplia gama de germoplasma de *Cynodon* a 4°C en un rango de 4 meses hasta más de un año.

Pyrus communis puede almacenarse a 4°C durante 12 a 18 meses (Bell and Reed, 2002).

3.3.3 Modificación del medio de cultivo

La modificación en la composición de los medios de cultivo es una forma de limitar el crecimiento, principalmente a través de la reducción en la concentración de elementos minerales, la reducción o cambio de la fuente de carbono (Engelmann, 1991; Rao, 2004). También se puede recurrir al uso de

concentraciones mayores de gelificantes, a la adición de agentes osmóticos y/o la incorporación de retardadores de crecimiento (Engelmann, 1991).

3.3.3.1 Concentración de minerales

El crecimiento *in vitro* de plantas de yuca disminuyó proporcionalmente con el contenido de nitrógeno total del medio de cultivo; concentraciones por debajo de 10mM, en término de número de tallos y nudos por tallos resultaron perjudiciales (Roca *et al.*, 1994).

Autores como García *et al.* (2004) conservaron, con calidad y durante seis meses sin realizar subcultivos, plantas *in vitro* de caña de azúcar, con la reducción de las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962) entre 25 y 50% de su concentración normal. (García, *et al.*, 2007)

3.3.3.2 Fuente de carbono

En las plantas de campo uno de los principales factores que determinan el crecimiento vegetal es la síntesis, transporte y metabolismo de azúcares (fuente de carbono y energía). (Lemoine, 2013). Mientras las regiones verdes fototróficas (órganos fuente) de la planta sintetiza azúcares como producto de la fotosíntesis durante el día, las regiones no verdes (órganos vertedero) dependen de un aporte constante de azúcares (Büttner, 2007).

Los cultivos *in vitro* no son suficientemente autotróficos y el crecimiento tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis o incluso en obscuridad, por lo tanto, la adición de azúcares al medio de cultivo es fundamental para satisfacer la demanda energética y de carbono que genera el crecimiento y desarrollo celular (Ertola, 1994; Pierik, 1990, Rukundo *et al.*, 2012), además de tener efecto en la fisiología, crecimiento y diferenciación de las células (Soo-Cheon, 2013).

La sacarosa, en concentraciones del 2 al 4 % (p/v), constituye la fuente de carbono más utilizada en los medios de cultivo ya que es sintetizada, transportada y metabolizada de manera natural en las plantas (Pierik, 1990), y

en diversos estudios se concluyó que la sacarosa mantiene en niveles óptimos la tasa de crecimiento (Cuenca y Vieitez, 2000; Fuentes *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2001; Soo-Cheon, 2013). Además de la sacarosa otros azúcares como la, glucosa, maltosa, fructosa y sorbitol se han utilizado en el cultivo *in vitro* sin embargo éstas suelen funcionar solo para determinadas especies.

3.3.3.2.1 Sorbitol y Manitol

Los azúcares alcoholes son producto de la reducción de las aldosas o cetosas. El manitol es un azúcar alcohol que se forma por la reducción del grupo aldehído de la manosa, mientras que el sorbitol resulta de la reducción del grupo aldehído de la glucosa (Taiz, 2002). Ambos son los azúcares alcoholes de mayor distribución en las plantas, los encontramos en más de 100 especies (Stoop *et al.*, 1996).

De manera generalizada, las plantas superiores sintetizan y transportan sacarosa como la principal fuente de carbono de los órganos fuente a los órganos sumidero donde ésta puede usarse en el metabolismo y el crecimiento o para almacenarse como reserva (Azcon-Bieto y Talón, 2003; Lemoine 2013). Existen especies vegetales que pueden sintetizar, transportar y metabolizar simultáneamente junto con la sacarosa, azúcares alcoholes como el manitol y el sorbitol (Azcon-Bieto y Talón, 2003; Karakas, 2001).

3.3.3.2.1.1 Metabolismo del manitol

La presencia de manitol ha sido detectada en más de 100 especies de 70 familias de plantas vasculares, incluyendo muchos cultivos de importancia agronómica, por mencionar algunas; Oleaceae (olivo), Apiaceae (apio, zanahoria, y perejil) y Rubiaceae (café). También se encuentra y/o es metabolizado por especies de Brassicaceae (cabbage), Cucurbitaceae (calabaza), Fabaceae (frijol y chícharo) donde, el manitol es uno de los principales productos fotosintéticos (Stoop, 1996). En el apio (*Apium graveolens*), el manitol es sintetizado en igual proporción que la sacarosa y

constituye aproximadamente el 50% de los fotoasimilados que se transportan en la planta (Loescher *et al.*, 1992).

Estudios en apio (*Apium graveolens* L.) y alheña (*Ligustrum vulgare* L.), revelan que la manosa 6-fosfato (M6P) y manitol 1-phosphate se encuentran dentro de los productos fotosintéticos tempranos (Loescher, 1992).

La enzima M6P-reductasa dependiente de NADPH localizada en el citoplasma de las células de hojas de apio cataliza la reacción para convertir la manosa 6-fosfato en manitol (Loescher, 1992; Stoop, 1993).

Una vez sintetizado el manitol es transportado a través del floema, de los órganos fuente hacia los órganos vertedero (raíz, fruto) en cuyas células se encuentra la enzima manitol deshidrogenasa (MDH). La MDH representa el primer paso de la ruta enzimática para la asimilación de manitol en los tejidos vertedero, mediante la conversión del manitol a manosa. La manosa es fosforilada y, finalmente la manosa 6-fosfato es transformada a fructosa6-p, que puede entrar al metabolismo central de la célula (Loescher, 1992; Stoop, 1993)

Por lo tanto, es probable que el crecimiento de células cultivadas en manitol esté restringido a especies que metabolizan estos azúcares. En muchas especies la manosa es fosforilada pero no puede ser metabolizada (Fig.1) (Stoop 1993).

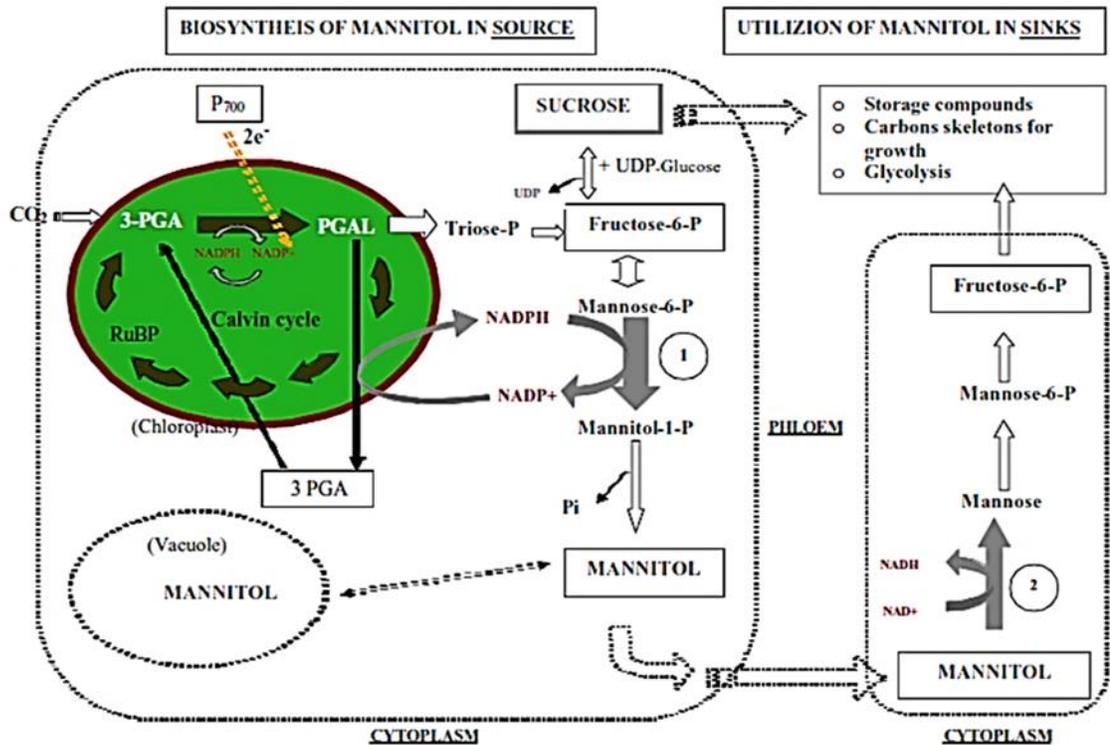


Figura 1. Síntesis, transporte y catabolismo del manitol en las plantas (tomado de Karakas, 2001)

3.3.3.2.1.2 Metabolismo del sorbitol

El sorbitol es el producto fotosintético primario en plantas de la familia Oleaceae y en la mayoría de los miembros de la familia Rosaceae, incluidos varios géneros de importancia económica como *Malus* (manzanas), *Pyrus* (pera), y *Prunus* (durazno, cereza, ciruela, almendra y chabacano) (Karakas, 2001; Liang *et al.*, 2012; Stoop, 1993).

La enzima sorbitol 6-fosfatodeshidrogenasa dependiente de NADPH (S6PDH) una aldosa 6-fosfato reductasa se localiza en el citoplasma de las células de hojas maduras de Rosaceae y se encarga de convertir la glucosa 6-fosfato en sorbitol 6-fosfato (Kanayama *et al.* 1992), que es desfosforilado por la enzima sorbitol 6-fosfato fosfatasa (Zhou *et al.* 2003). El sorbitol es transportado de los órganos fuente hacia los órganos vertedero a través del floema (Rumpho, 1983).

En los órganos vertedero como los frutos y las hojas en desarrollo la enzima sorbitol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (SDH) oxida al sorbitol y lo convierte en fructosa, azúcar que puede ser metabolizada por los tejidos (Kuo *et al.*, 2000; Oura *et al.* 2000; Rumpho, 1983) (Fig 2.)

La SDH también ha sido detectada en plantas que no perteneces a la familia Rosaceae y que sintetizan sacarosa como azúcar principal para el transporte de fotosintatos.

Kuo y colaboradores (1990) encontraron que los ejes embrionarios de semillas de frijol acumulan sorbitol durante la germinación y presentan actividad de SDH.

En 2005 Ohta y colaboradores aportaron evidencias moleculares de la presencia sorbitol deshidrogenasa en tomate (*Lycopersicon esculentum*), una planta de la familia Solanaceae que produce sorbitol en muy bajas cantidades.

Swedlund and Locy (1993), detectaron actividad de la SDH en callos embriónicos de maíz (*Zea mays*) cultivados en medio con sorbitol como fuente de carbono.

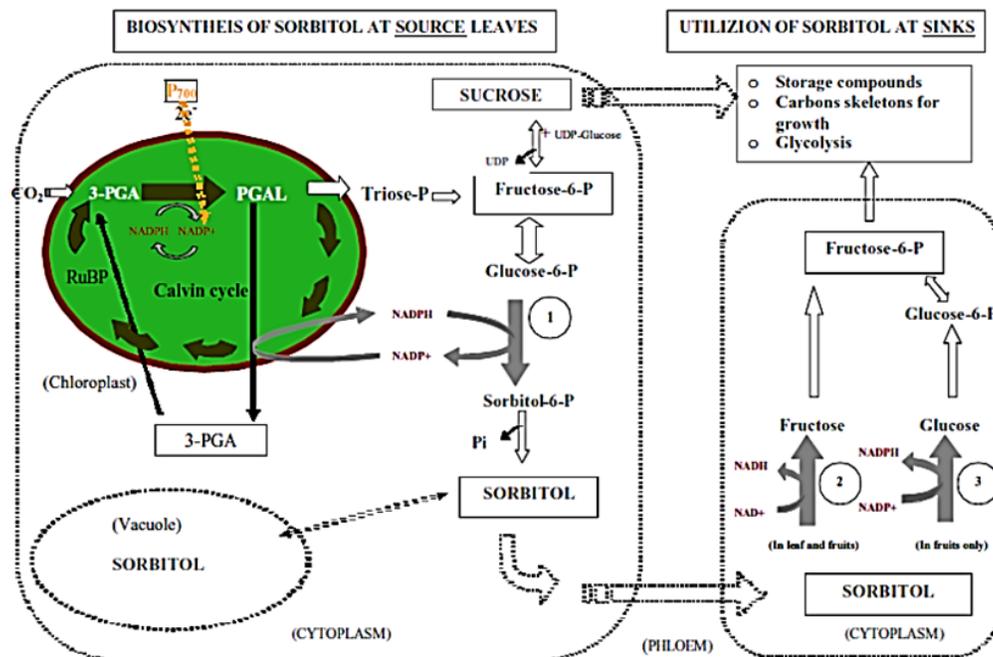


Figura 2. Síntesis, transporte y catabolismo del sorbitol en las plantas (tomado de Karakas, 2001)

3.3.3.2.2 Manitol o Sorbitol como fuente de carbono *in vitro*

Se ha observado que el manitol o sorbitol pueden funcionar como fuente de carbono y energía para cultivos *in vitro* cuando la especie con la que se está trabajando produce estos azúcares alcoholes de manera natural o posee enzimas que le permiten metabolizarlo (Kadota y Nimmi, 2004; Marino *et al.*, 1993).

Stoop (1993) reporta que el uso de manitol en cultivos en suspensión de *Dacus carota* (zanahoria) se producen en tasas bajas y en tasas más altas en que las hojas de *Syringa vulgaris* (lilo); ambas, especies producen manitol de manera natural. Cultivos en suspensión de apio (*Apium graveolens*) crecieron normalmente en un medio de cultivo suplementado con manitol, esto se debió a que el apio posee la enzima Manitol Deshidrogenasa dependiente de NAD que convierte el manitol a manosa. La manosa puede ser fosforilada y metabolizada por la fosfomanosa isomerasa a fructosa 6 fosfato, la cual puede entrar al metabolismo central.

El sorbitol es buena fuente de carbono para cultivos de manzana, durazno y 11 especies más de plantas de la familia Rosaceae (Stoop, 1993). Marino *et al.* (1993) y Pua; Chong (1985) encontraron que el crecimiento de los brotes de chabacano y manzana, (Rosaceae), se aceleraba cuando usaban sorbitol como fuente de carbono en el medio de cultivo.

En especies vegetales que carecen de las enzimas necesarias para metabolizar el manitol o sorbitol, el uso de éstos como fuente de carbono puede disminuir la tasa de crecimiento, la capacidad de morfogénesis o la sobrevivencia del cultivo (Kadota y Nimmi, 2004).

Rukundo (2012) realizó experimentos para determinar los efectos de la, sacarosa o manitol como fuente de carbono, en el crecimiento de plántulas de plátano. De manera general encontró que, las plántulas crecidas en medio con sacarosa alcanzaron mayor longitud y peso fresco comparadas con las plántulas que crecieron con manitol.

Kadota y Nimmi (2004) reportaron que el sorbitol es la mejor fuente de carbono para lograr la brotación en ápices de pera japonesa (Rosaceae); mientras que, si se usaba manitol, los brotes no producían raíces y morían después de 6 semanas de cultivo.

Ciobanu y Constantinovici (2012) Lograron disminuir el crecimiento y mantener la viabilidad de plántulas de 5 variedades de papa durante 17 meses al emplear 40 g/l-1 de sorbitol como fuente de carbono en el medio de cultivo. Las plantas alcanzaron una altura de 2 a 4 cm pues desarrollaron entrenudos más cortos.

3.3.3.3 Agentes osmóticos

El crecimiento lento en cultivos *in vitro* puede propiciarse mediante la adición de agentes osmóticos, sustancias que inducen cambios en el potencial osmótico del medio de cultivo *in vitro* sin interferir con el metabolismo de carbono en la planta.

El potencial osmótico está determinado por la concentración de solutos disueltos. En el medio de cultivo los azúcares y macronutrientes determinan el potencial osmótico (Azcon-Bieto y Talón, 2003; Pierik, 1990).

EL potencial osmótico está íntimamente ligado a la presión de turgencia que es la fuerza motriz para la elongación celular, cuando el potencial osmótico es más negativo en el interior de la célula que en el medio, el agua entra a la célula aumenta el volumen vacuolar y ejerce presión de turgencia sobre las paredes celulares, induciendo a que éstas se expandan y aumente la longitud de la célula. (Azcon- Bieto y Talón 2003; Roca *et al.* 1991). A medida que aumentamos la concentración de solutos en el medio, el potencial se hace más negativo y se reduce la absorción de agua, ocasionando una disminución de la presión de turgencia y en consecuencia reduciendo el crecimiento de la planta.

George (1993) señala que las células mantenidas en un ambiente con bajo potencial osmótico pierden agua y disminuyen su potencial hídrico, alterando su morfogénesis y velocidad de crecimiento.

El potencial osmótico siempre posee valores negativos sin embargo Pierik (1990) indica que el crecimiento y organogénesis de los explantes se detienen cuando el potencial osmótico del medio es más negativo que -0.3 MPa debido a la baja absorción de agua.

Como agentes osmóticos se puede emplear la sacarosa en elevadas concentraciones, debido a que es altamente metabolizable, y los azúcares alcohol como el manitol y el sorbitol (Roca *et al.* 1991).

El empleo de fuentes de carbono diferentes a la sacarosa como el sorbitol o manitol que no pueden ser metabolizadas o que se metabolizan más lento representan una opción para reducir la tasa de crecimiento de los cultivos *in vitro*.

3.3.3.3.1 Manitol como agente osmótico

Se ha reportado que el manitol, en algunas especies se difunde lentamente entre el espacio extracelular pero no puede entrar a las células y ser metabolizado por los tejidos de la planta, adicionalmente su presencia no interfiere con la actividad enzimática. Por estas razones es empleado frecuentemente como agente para modificar el potencial osmótico del medio de cultivo, y promover estrés hídrico artificial en explantes *in vitro* (George, 1993;; Taiz, 2002; Stoop, 1993; Whitters y Engelmann 1997).

Frensch y Hsiao (1994) emplearon manitol para cambiar el potencial hídrico del cultivo *in vitro* de raíces de maíz. Tras la adición del manitol la presión de turgencia disminuyó rápidamente y la tasa de elongación de la raíz se detuvo por completo; El crecimiento de las raíces se recuperó pero a tasas más bajas cuando el cultivo se transfirió al medio de recuperación con sacarosa.

3.3.4 Variación genética en plantas conservadas *in vitro*

Una desventaja de los métodos de propagación y/o conservación *in vitro* consiste en el riesgo de que se produzcan alteraciones en las características morfológicas, tasa de crecimiento, periodo de floración, productividad, entre otros, de los cultivos obtenidos con respecto al material inicial.

Variación somaclonal es el término que se utiliza para definir la variabilidad que se genera durante el cultivo y/o conservación *in vitro*, la cual es resultado de cambios genéticos y epigenéticos (alteración en la expresión de los genes). (Larkin and Scowcroft 1981).

La frecuencia de la variación somaclonal puede incrementarse conforme aumenta el tiempo de cultivo o conservación *in vitro*, o por usar material vegetal no diferenciado como callos, protoplastos o células en suspensión.

3.3.4.1 Indicadores o mediciones de variación génica

La habilidad para identificar variación somaclonal es indispensable para el manejo y uso efectivo de los recursos genéticos. Tradicionalmente, la variabilidad se evalúa mediante la medición de la variación en rasgos fenotípicos, tales como color de la flor, hábito de crecimiento o caracteres agronómicos cuantitativos como potencial de rendimiento, tolerancia al estrés, entre otros. Sin embargo la información proporcionada por caracteres morfológicos es limitada.

Actualmente el grado de variabilidad somaclonal puede ser evaluado mediante marcadores moleculares.

3.3.4.1.1. Marcadores Moleculares: RAPD

La tecnología de RAPD (Random Amplified Polymorphysm DNA, por sus siglas en inglés) ha sido uno de las metodologías más utilizadas por su sensibilidad, amplitud y bajo costo, además no se requiere información previa de la secuencia de ADN para poder usar un iniciador; no es necesario realizar marcaje con radioisotopos y solo se emplean pequeñas cantidades de ADN templado (Williams *et al.*, 1990). Es una técnica basada en la amplificación del genoma, por la probabilidad de alineamiento de los iniciadores a diferentes regiones del ADN (Williams *et al.*, 1990).

Esta técnica es aplicable cuando se prueban un número considerable de iniciadores y seleccionando pocos fragmentos RAPD repetibles y claramente

interpretables. Es atractivo para caracterizar variedades, y útil para una rápida detección de variaciones genéticas a nivel de ADN (Rival *et al.*, 1998).

3.3.4.1.2 Base molecular de los RAPDs

Los RAPD emplean iniciadores de 10 nucleótidos con un contenido de GC (guanina-citocina) al menos del 50 %. Los productos de PCR (polimerase chain reaction) son separados en gel de agarosa y detectados por tinción con bromuro de etidio. Para obtener un producto amplificado con un solo iniciador, deben de haber dos secuencias blanco idénticas (o al menos altamente similar) y cercanos: un sitio en una cadena y el otro sitio en la otra cadena, en una orientación opuesta. Teóricamente, los polimorfismos RAPD pueden resultar de varios tipos de eventos: (1) inserción de un fragmento largo de DNA entre los sitios de unión de iniciadores, lo que debe exceder la capacidad de la PCR, resultando en la pérdida del fragmento; (2) inserción o delación de un fragmento pequeño de ADN, cambiando el tamaño de un fragmento amplificado; (3) deleción de uno de los dos sitios de alineamiento del iniciador, ocasionando la pérdida del fragmento o un incremento en el tamaño; (4) la sustitución de un nucleótido dentro de uno o en ambos sitios blanco del iniciador puede afectar el proceso de alineamiento, originando la presencia o ausencia de polimorfismo o un cambio en el tamaño del fragmento (Weising *et al.*, 2005).

3.3.4.1.3 Propiedades de los marcadores RAPD

Dado que las secuencias de los iniciadores RAPD se diseñan arbitrariamente, se espera que el genoma sea muestreado aleatoriamente. Una desventaja de los RAPD con respecto a otros marcadores multilocus es su herencia dominante, que limita su uso en poblaciones genéticas y estudios de mapeo. Se observan fragmentos en una condición de homocigosis (AA) así como en heterocigosis (Aa), y solo la ausencia del fragmento revela claramente el genotipo recesivo en homocigocis (aa). Para muchas aplicaciones, la naturaleza dominante de los fragmentos RAPD es una desventaja (ejemplo en poblaciones genéticas). La herencia dominante no es problemático en situaciones de haploides ni en el estudio de variaciones de DNA (Weising *et al.*, 2005).

El uso de los fragmentos RAPD como marcadores moleculares es en ocasiones complicado por la variación en la intensidad de las bandas. La claridad de una banda dependerá de varios factores, como el grado de repetitibilidad de una región blanco de ADN, la extensión de un mal alineamiento primer-templado, y la presencia o ausencia de regiones blanco de competencia por iniciadores en el genoma. La variación en la intensidad de las bandas comigrantes es una de las molestias encontradas durante la conversión de un patrón de bandeo a una matriz binaria de caracteres.

IV MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

La planta madre de crisantemo, se cultivó en cajas magenta por tres períodos de seis semanas cada uno. Para multiplicar los brotes, se utilizó medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con AIA $1\text{mg}\cdot\text{litro}^{-1}$, BAP $3\text{mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ y sacarosa $30\text{g}\cdot\text{litro}^{-1}$, solidificado con agar $7\text{g}\cdot\text{litro}^{-1}$, a pH de 5.7. Los cultivos fueron incubados a 25 ± 1 °C bajo un fotoperiodo de 16/8 horas (luz/obscuridad) con una intensidad lumínica de $68\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, provista por lámparas fluorescentes blancas.

Para los experimentos, se emplearon plántulas de crisantemo subcultivadas dos veces por lapsos de seis semanas; a los 15 días del tercer subcultivo se obtuvieron, como explantes, segmentos de tallo de 1.5 cm, con dos yemas axilares cada uno.

4.2 Procedimiento de conservación

Los explantes se sembraron y mantuvieron en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS) sin hormonas, solidificado con agar $7\ \text{g}\cdot\text{litro}^{-1}$ con pH de 5.7 y distribuido en tubos (25 x 200 mm) a razón de 15 ml de medio. Para restringir el intercambio gaseoso y mantener los explantes libres de contaminación, los tubos de cultivo se sellaron con parafilm y se mantuvieron con luz tenue y fotoperiodo de 16/8 h luz/obscuridad.

A fin de determinar las mejores condiciones para el crecimiento lento, se realizaron 8 tratamientos experimentales en los que se probaron dos azúcares: sorbitol (2 % y 4 %) y manitol (2 % y 4 %) bajo dos condiciones de temperatura (4 °C y 25 °C).

Cuadro 1. Combinaciones de temperatura, tipo y concentración de fuente de carbono para la conservación *in vitro* en crecimiento lento

Temperatura/Azúcar	Manitol		Sorbitol	
	2%	4%	2%	4%
4°C	1	2	3	4
25°C	5	6	7	8

Después de aplicar los tratamientos durante un período de 10 meses, las plántulas se transfirieron a un medio MS sin hormonas que permite la recuperación de los brotes y su crecimiento. Se evaluó la longitud de las plántulas, el número de hojas y la sobrevivencia.

Como tratamientos control se utilizaron cultivos en crecimiento con sacarosa 3% a 4 °C y 25°C.

4.2.1 Análisis estadístico

Se empleó un diseño experimental completamente al azar con 16 repeticiones (Cuadro 1). La unidad experimental consistió de un tubo de cultivo con una planta. Después de un período de 10 meses de aplicar los tratamientos de crecimiento lento, se evaluó lo siguiente: altura de planta, número de hojas y porcentaje de sobrevivencia. Para altura de planta y número de hojas se realizaron análisis de varianza y comparaciones de medias de Tukey (P=0.5) con el paquete estadístico SAS V9. El porcentaje de sobrevivencia fue analizado mediante pruebas de comparación de dos proporciones binomiales por pares de tratamientos (Infante y Zárate, 1984).

4.3 Estabilidad genética

Se tomaron cinco muestras de ADN de plántulas provenientes de cada uno de los diez tratamientos evaluados, con lo que se obtuvo un total de 50 muestras de ADN. Como control para la estabilidad genética, se obtuvieron cinco muestras de ADN de plántulas que fueron mantenidas en propagación *in vitro*

bajo condiciones estandar (medio MS con 3 % de sacarosa a 25°C subcultivado cada cuatro semanas) sin pasar por la conservación en crecimiento lento.

4.3.1 Extracción de ADN

El ADN fue extraído de hojas de las plántulas después de 10 meses de conservación en crecimiento lento, con el método de Dellaporta *et al.* (1983) con algunas modificaciones.

Se tomaron 200 mg de tejido fresco para pulverizarlo en nitrógeno líquido; el tejido pulverizado de cada muestra se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml, que contenían 600 µl de amortiguador de extracción con el que se mezcló, agitando por unos segundos; se incubó a 65°C por 10 min, realizando inversión ocasional de los tubos; se adicionó 200 µl de acetato de potasio 5M, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 30 min. Después se centrifugó a 15,000xg durante 10 min a temperatura ambiente, el sobrenadante se transfirió a un tubo con 700 µl de isopropanol frío. Se mezcló por inversión y se colocó a -20°C durante 30 min; en seguida, se centrifugó por 5 min a 10,000xg a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y, el precipitado fue disuelto en 200 µl de solución para diluir.

Para eliminar el ARN se añadió 2 µl de ARNasa y se incubó a 37°C por una hora, se agregó 20 µl de acetato de sodio 3M y 200 µl de isopropanol frío; se mezcló por inversión y se dejó precipitar a -20°C por 2 h. Después se centrifugó por 5 min a 10,000xg a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 300 µl de etanol al 70 %, se dejó secar la pastilla y después se disolvió en 50 µl de TE y se almacenó a 4°C. En el cuadro 2 hace referencia a los reactivos empleados y las concentraciones de los mismos para llevar a cabo la de extracción de ADN.

Cuadro 2. Reactivos empleados en la preparación de amortiguadores.

REACTIVOS	AMORTIGUADORES
Amortiguador de extracción	Tris-HCl 100 mM, EDTA-Na ₂ 50 m, NaCl 500 mM, 2-Mercaptoetanol 10 mM, SDS 1.3 %, pH 8.0.
Solución para diluir	Tris-HCl 50 mM EDTA-Na ₂ 10 mM, pH 8.0.
ARNasa	10 mg/ml EN Tris-HCl 10 mM, CaCl ₂ mM, glicerol 50 % pH 7.0. Antes de usar, hervir en baño de agua por 30 min.
Acetato de potasio	5M
Acetato de sodio	3M
Isopropanol frío	-20 o C
Etanol	70 % (v/v)

4.3.2 Obtención de los patrones RAPD

Se utilizaron siete iniciadores ROTH (de Karlsruhe Rheinhafen, Alemania) para generar los patrones de ADN.

Cuadro 3. Iniciadores ROTH-B para generar marcadores RAPD

Iniciador	Secuencia de nucleótidos (5'-3')
ROTH-01	GTTTCGCTCC
ROTH-02	TGATCCCTGG
ROTH-03	CATCCCCCTG
ROTH-04	GGACTGGAGT
ROTH-05	TGCGCCCTTC
ROTH-06	TGCTCTGCCC
ROTH-07	GGTGACGCAG

4.3.2.1 Mezcla de reacción de la PCR para la obtención de los patrones RAPDs

Las reacciones de amplificación del ADN se realizaron en un volumen de 26.05 µl con 40 ng de ADN templado, 20 pM de cada decanucleótido, 16 µM de cada dNTP, 5 µM de Mg²⁺, y 1 unidad de Taq ADN polimerasa en un amortiguador manufacturado por el proveedor de la enzima (Fermentas®). La amplificación se realizó en termociclador TECHNE TC-412 (Duxford, Cambridge, UK) programado como sigue: un ciclo de 1 minuto a 94 °C, 38 ciclos de 45 s a 92 °C, 1 minuto a 37 °C, y 2 minutos a 72 °C, seguido por un ciclo de 3 minutos a 72 °C.

4.3.2.1 Análisis de datos

Para observar los patrones RAPDS se realizó una electroforesis con muestras alícuotas de 12 µl de productos amplificados en un gel de agarosa a 1.5 % (w/v) con buffer TAE 0.5 X, seguido de tinción en bromuro de etidio, visualización y fotograbado bajo luz UV. El peso molecular se estimó por referencia a un marcador . O'GeneRuler™ de 1 kb DNA Ladder de Fermentas®. Todas las amplificaciones se repitieron dos veces, y para el análisis sólo se consideraron las bandas reproducibles y claramente interpretables en las corridas electroforéticas.

La comparación entre las muestras de ADN de plántulas conservadas se realizó mediante la observación de las similitudes y las diferencias en los patrones de bandas, dando un valor de 0 a la ausencia y de 1 a la presencia de una banda. Se cuantificó el número de bandas producto de la amplificación para cada iniciador. Se realizó un registro de los patrones RAPDs obtenidos con los 7 iniciadores para todas las plántulas y con esa información se construyó una tabla para indicar el número de bandas amplificadas por cada iniciador.

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Conservación en crecimiento lento

5.1.1 Efecto de la Temperatura

Al reducir la temperatura de incubación a 4°C se observó que las plántulas crecieron en promedio 4.2cm, y a 25°C la altura promedio fue de 9.8 cm (Fig.3). A 4°C las plántulas redujeron su crecimiento hasta un 50% comparadas con las de 25 ° C. Estos resultados indicaron que la temperatura afectó directamente el desarrollo de las plántulas de crisantemo.

También se observaron diferencias en el porcentaje de sobrevivencia; 93.3% a 4°C y 16.7% a 25°C. La reducción de la temperatura permitió que mayor porcentaje de las plántulas sobreviviera después de 10 meses almacenaje.

La disminución en el crecimiento de las plántulas se puede interpretar a la luz de lo que se sabe sobre los cambios morfológicos y metabólicos que ocurren en la célula cuando se expone a las plántulas a bajas temperaturas.

A nivel de membrana celular es la primera que se afecta ante el estrés térmico, cambia su composición lipídica y se vuelve más rígida, interfiriendo con la elongación celular (Krasensky y Jonak, 2012; Taiz, 2000; Theocharis et al., 2012). También ocurren cambios en el citoesqueleto, que afectan los procesos de división celular, estabilidad del tamaño de la célula y el proceso de secreción y transporte a través del cual llegan nuevos componentes a la membrana y pared celular durante el crecimiento de la célula (Huják y Salak, 2010)

En el metabolismo se reduce la síntesis de proteínas y la actividad enzimática; baja la tasa de respiración celular, interfiriendo con el metabolismo de la glucosa y la producción de ATP y el transporte de los carbohidratos se hace más lento.

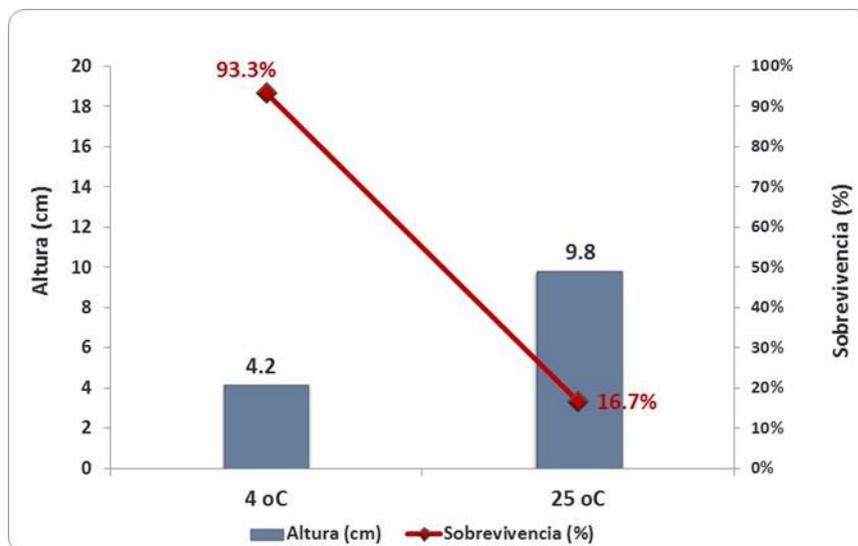


Figura 3. Efecto de la temperatura 4 y 25°C en la altura de las plántulas y porcentaje de supervivencia.

5.1.2 Efecto del tipo de fuente de carbono

La figura 4 muestra que las plántulas en medio de cultivo con sacarosa alcanzaron mayor altura (15.0cm), comparadas con plántulas crecidas en medios con sorbitol (8.1 cm) y manitol (1.9 cm). Sin embargo sólo el 50% de ellas sobrevivió, aun cuando la sacarosa es el azúcar que mejor metabolizan las plántulas, esto se explica a partir de que, al ser la sacarosa el principal producto fotosintético de las plántulas, éstas poseen los transportadores y enzimas necesarios para incorporar el azúcar al interior de la célula y metabolizarla rápidamente, por lo tanto, después de 10 meses de almacenaje es muy probable las plántulas de crisantemo agotaran toda el azúcar del medio y al no ser completamente autotróficas como ocurre con los cultivos *in vitro*, no produjeron suficiente sacarosa para mantener y satisfacer los requerimientos del crecimiento sin una fuente externa de carbono (Ertola, 1994; Pierik, 1990, Rukundo *et al.*, 2012).

Los cultivos *in vitro* que se mantienen en medios con sacarosa y a temperaturas normales (30g l⁻¹ y 25°C) requieren ser subcultivados al menos cada cuatro semanas para que las plántulas puedan sobrevivir, ya que crecen rápidamente y agotan los nutrientes del medio (Pierik, 1990).

El uso de sorbitol como fuente de carbono resultó una buena opción pues las plántulas mantuvieron un crecimiento intermedio de 8.1 cm comparado con la sacarosa (Fig. 4).

Aunque no hay reportes acerca de la producción de sorbitol ni de la presencia de enzima sorbitol deshidrogenasa en crisantemo, el hecho de que las plántulas se mantuvieran y crecieran en presencia de este azúcar alcohol, podrían ser un indicador de que el crisantemo sintetiza la enzima sorbitol deshidrogenasa o una enzima con una función similar. Lo anterior es probable ya que estudios en tomate (*Lycopersicon esculentum*) y en *Arabidopsis thaliana*, en donde el sorbitol no forma parte de los productos primarios de la fotosíntesis, se ha reportado la presencia de enzimas con actividad sorbitol dehidrogenasa (Aguayo *et al.*, 2013; Ohta *et al.*, 2005;).

Si las plántulas de crisantemo pueden metabolizar el sorbitol es probable que lo hagan a menor velocidad que la sacarosa pues debe considerarse que una vez que el sorbitol es introducido a la célula, éste debe ser transformado primero a fructosa y finalmente a fructosa 6-p para que pueda incorporarse al metabolismo central de la misma(Karakas, 2001). Si el sorbitol se usa más lentamente tarda más tiempo en agotarse y permite conservar a las plántulas por más tiempo sin necesidad de subcultivos frecuentes que renueven la fuente de carbono.

Las plántulas crecidas en medio de cultivo con manitol fueron las que presentaron un crecimiento menor de solo 1.9 cm. También fue el tratamiento con menor porcentaje de sobrevivencia (41.7 %).

La baja tasa de crecimiento y sobrevivencia de las plántulas en presencia de manitol puede deberse a que el crisantemo no posee la enzima manitol deshidrogenasa o enzimas con una función semejante, necesarias para metabolizar este azúcar alcohol, además podemos suponer que las plántulas que sobrevivieron con éste tratamiento lograron hacerlo con el azúcar que ellas pudieran sintetizar.

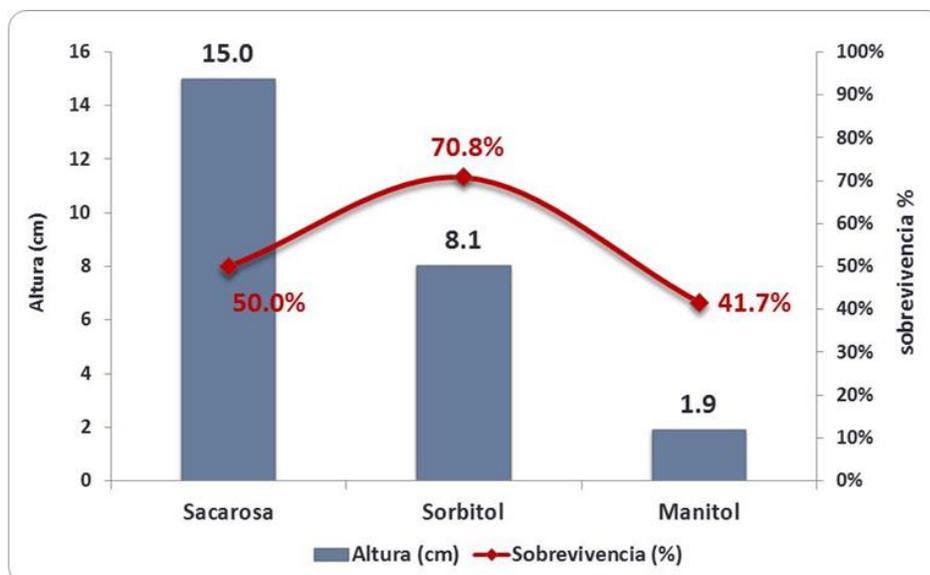


Figura 4 Efecto del tipo de fuente de carbono en el crecimiento y supervivencia de plántulas de crisantemo.

5.1.3 Efecto de la concentración de la fuente de carbono

La limitación del crecimiento por cambios en el potencial osmótico se debe a la reducción de la absorción de agua; conforme el potencial se hace más negativo, se absorbe menos agua, la presión de turgencia sobre la pared celular disminuye y en consecuencia la expansión celular se detiene (Taiz, 2000)

La capacidad de la célula de absorber agua está en función del potencial osmótico del medio, el cual está determinado en gran medida por solutos que lo conforman, principalmente macronutrientes y fuente de carbono; el incremento en la concentración de los solutos hace más negativo el potencial osmótico y en consecuencia se reduce la absorción de agua (Rukundo, 2012).

A fin de comprobar el efecto osmótico en el crecimiento de las plántulas, se decidió utilizar el sorbitol y manitol en dos concentraciones 2 y 4 %, dicha elección fue con base en que, para ambas concentraciones el potencial osmótico estimado fue más negativo, - 0.48 MPa al 2% y -0.77MPa al 4%, que el de la sacarosa -0.39MPa al 3% en los tratamientos control (Cárdenas-Lara y Villegas –Monter, 2002).

Al emplear fuentes de carbono de manitol o sorbitol las plántulas crecieron menos en comparación con aquellas cultivadas en medio con sacarosa Sin

embargo cuando se compararon los resultados entre tratamientos de diferente concentración pero del mismo tipo de azúcar se observó poca o ninguna diferencia en la altura y sobrevivencia. (Fig.5) tal vez si se comparan concentraciones como 2 y 8% se logre apreciar alguna diferencia sin embargo es probable que a mayor concentración se reduzca la sobrevivencia.

Resulta interesante observar las diferencias de los resultados entre los tratamientos de sorbitol y manitol (Fig. 5), pues, debido a que el potencial osmótico para ambos es el mismo es de suponer que las plántulas tuvieran alturas similares y porcentajes de sobrevivencia parecidos con uno u otro tratamiento, sin embargo las plántulas con manitol apenas alcanzaron 2 cm de altura y la sobrevivencia fue solo del 47%. Esto nos hace pensar que posiblemente el manitol, al no poder ser metabolizado por las células causa mayor estrés osmótico y eso tiene un efecto negativo en la sobrevivencia de las plántulas.

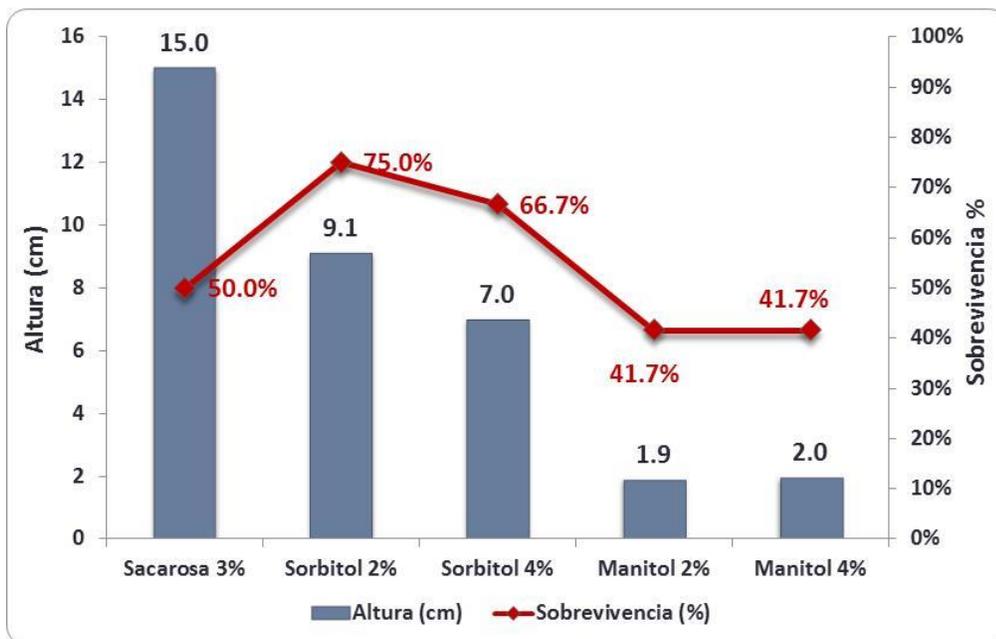


Figura 5 Efecto de la concentración de la fuente de carbono en la altura de las plántulas y porcentaje de sobrevivencia.

5.1.4 Interacción de los factores

De acuerdo con los resultados obtenidos, el tipo de azúcar sorbitol o manitol a concentraciones de 2% y 4%, y con temperaturas de incubación de 4 °C y 25 °C, modificaron estadísticamente ($P \leq 0.05$), la sobrevivencia de las plántulas.

Cuadro 4. Efecto de la temperatura, tipo y concentración de azúcar en la altura, número de hojas y sobrevivencia de plántulas de crisantemo *in vitro* durante 10 meses en crecimiento lento.

	Tratamientos	Altura (cm)	No. Hojas	Sobrevivencia (%)
1)	4 °C+Sacarosa 3%	7.9 c ^Z	14.3 d	100.0 a ^Y
2)	4 °C+Sorbitol 2%	4.5 d	13.7 d	100.0 a
3)	4 °C+Sorbitol 4%	4.0 d	9.7 e	100.0 a
4)	4 °C+Manitol 2%	2.2 d	7.2 e	83.3 b
5)	4 °C+Manitol 4%	2.3 d	8.8 e	83.3 b
6)	25 °C+Sacarosa 3%	22.1 a	39.7 a	0.0 e
7)	25 °C+Sorbitol 2%	13.7 b	28.7 b	50.0 c
8)	25 °C+Sorbitol 4%	10.0 c	22.5 c	33.3 d
9)	25 °C+Manitol 2%	1.6 d	1.6 e	0.0 e
10)	25 °C+Manitol 4%	1.6 d	1.6 e	0.0 e
	DMS	3.0	3.78	
	CV (%)	22.4	13.4	

^Z Valores con la misma letra en la columna altura y número de hojas son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \geq 0.05$).

^Y Valores con la misma letra en la columna sobrevivencia indica proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros p de la distribución binomial.

DMS: diferencia mínima significativa; CV: coeficiente de variación

Al comparar los resultados obtenidos con la interacción de los tres factores se corroboró la tendencia generalizada de que la sacarosa es la mejor fuente de azúcar para sostener y/o mantener el crecimiento *in vitro* de cultivos en propagación (Kadota y Nimmi, 2004), ya que las plántulas crecidas en medio con sacarosa 3% sometidas a 25°C o 4°C, alcanzaron mayor altura. Es importante resaltar que a 25°C y 3% de sacarosa las plántulas alcanzan mayor

altura, desarrollan tallos delgados, entrenudos alargados, gran número de hojas y de raíces en la base del tallo pero desafortunadamente no sobrevivieron hasta los 10 meses de almacenaje. Esto era de esperarse pues al crecer rápidamente y metabolizar con facilidad la sacarosa, requerirían subcultivos frecuentes para mantenerlas vivas, lo cual no está en concordancia con los objetivos de este trabajo pues lo que se busca es disminuir el número de subcultivos. En comparación las plántulas de los tratamientos con sorbitol a 25°C presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$), crecieron más lento, alcanzando menor altura y se obtuvo una sobrevivencia de hasta el 50%. Las plántulas desarrollaron entrenudos más cortos, con tallo más grueso, menor número de hojas y raíces (Cuadro 4; Fig. 6). Cuando se empleó manitol en cualquiera de sus dos concentraciones se obtuvieron las plántulas con menor altura pero ninguna sobrevivió a los 10 meses.

Estos resultados nos llevaron a la conclusión de que, de los azúcares que se probaron el sorbitol es la mejor fuente de carbono para la conservación *in vitro* de crisantemo.

La reducción de la temperatura de incubación mostró efectos positivos en la disminución de la velocidad de crecimiento de las plántulas para todos los tipos de azúcar, para sacarosa, manitol o sorbitol y en cualquier concentración. Las plántulas desarrollaron entrenudos más cortos, menor número de hojas y no se observó presencia de raíces en comparación al tratamiento de 25°C (Fig. 6). La combinación de sacarosa 3% o sorbitol 2 y 4% bajo 4°C resultó en el 100% de sobrevivencia a los 10 meses de conservación.

Cuando se contrastan los resultados obtenidos a 4 y 25°C a simple vista se podría pensar que con la sola reducción de temperatura sería suficiente para mantener en crecimiento lento a las plántulas, utilizando sacarosa o sorbitol pues con ambas se obtiene el 100% de sobrevivencia incluso con manitol el 83.3 % de sobrevivencia, lo cual es aceptable. Sin embargo, para determinar cuál de las interacciones fue la mejor se consideró que si durante el periodo de conservación la refrigeración falla o falta la corriente eléctrica y aumenta la temperatura hasta 25°C, el uso de sorbitol al 2% sería la mejor opción, dado

que bajo estas condiciones, en los experimentos, el 50% de las plántulas sobrevivió, mientras que con 4% de sorbitol, las plantas alcanzaron menos altura, y sólo sobrevivió el 33%. Sacarosa o manitol quedan descartadas pues en los tratamientos bajo 25°C con cualquiera de las dos fuentes de carbono la sobrevivencia fue del 0%.

Por las razones expuestas se concluyó que el mejor tratamiento para la conservación *in vitro* en crecimiento lento fue a 4 °C de temperatura y 2% de sorbitol en el medio de cultivo. En este caso las plantas alcanzaron en promedio 4.5 cm de altura y produjeron 9.7 hojas; la sobrevivencia fue del 100% y se logró recuperación total en la proliferación celular cuando se transfirió al medio de recuperación.

Las plántulas sometidas a conservación desarrollaron cambios morfológicos , como menor número de hojas, entrenudos cortos, y poca o nula cantidad de raíces, en comparación con las plántulas del tratamiento control, que se desarrollaron de manera normal (tallos largos, gran cantidad de hojas y raíces) (Fig. 6). Los cambios morfológicos observados posiblemente sean respuesta de las condiciones del estrés debidos a la temperatura, la fuente de carbono y el estrés osmótico a que fueron sometidas las plántulas de crisantemo.

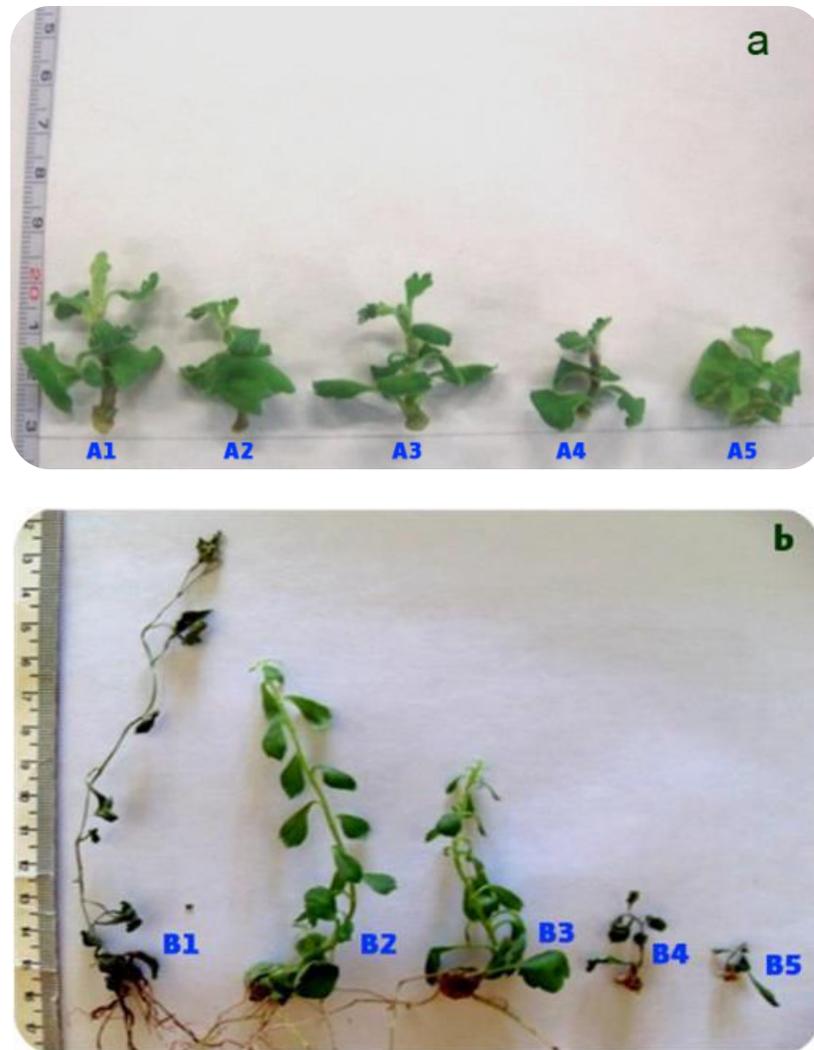


Figura 6. Conservación *in vitro* de crisantemo después de 10 meses bajo crecimiento mínimo. a) Plántulas a 4°C: A1 control en sacarosa 3%, A2 sorbitol 2 %, A3 sorbitol 4 %, A4 manitol 2 % y A5 manitol 4 %. b) Plántulas a 25°C: B1 control en sacarosa 3%, B2 sorbitol 2 %, B3 sorbitol 4 %, B4 manitol 2 % y B5 manitol 4 %.

5.2 Estabilidad genética de las plántulas

5.2.1 Análisis con RAPDs

Para descartar que la variación somaclonal que se presenta frecuentemente bajo cultivo *in vitro* pudieran deberse a cambios de tipo genético se llevaron a cabo análisis RAPDs de los cultivos mantenidos en las diferentes condiciones descritas.

Con siete iniciadores, la técnica RAPD amplificaron 88 bandas monomórficas para cada muestra de ADN (Cuadro 5), y no se encontraron bandas polimórficas. El mayor número de fragmentos de ADN amplificados se generaron con los iniciadores ROTH-01, ROTH-04 y ROTH-06 (16, 16, y 17 bandas, respectivamente). Se observaron pocas huellas de ADN de 7 y 6 bandas con los iniciadores ROTH-02 y ROTH-03, respectivamente. Esto manifestó que existen pocas repeticiones de ADN para la secuencia de nucleótidos de estos iniciadores en el genoma de crisantemo 'Indianápolis'. Por lo tanto, estos iniciadores contribuyen poco en la detección de cambios genéticos en la variedad estudiada.

Cuadro 5. Número de bandas RAPDs detectadas por cada iniciador en muestras de ADN de plántulas conservadas por 10 meses en crecimiento lento.

Iniciador	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Bandas	
		Monomórficas	Polimórficas
ROTH-01	GTTTCGCTCC	16	0
ROTH-02	TGATCCCTGG	7	0
ROTH-03	CATCCCCCTG	6	0
ROTH-04	GGACTGGAGT	16	0
ROTH-05	TGCGCCCTTC	13	0
ROTH-06	TGCTCTGCCC	17	0
ROTH-07	GGTGACGCAG	13	0
Total		88	0

La ausencia de bandas polimórficas (Fig. 7) revela que no hay variación genética detectable mediante RAPDs por efecto del crecimiento mínimo. Esto puede deberse a que el material propagado no pasó por una etapa de callo, lo cual incrementaría las posibilidades de producir algún tipo de variación somaclonal. Si bien no se encontraron cambios genéticos con estos marcadores, no se debe descartar la posibilidad de que ocurran cambios epigenéticos. Cada vez hay más evidencias que las alteraciones morfológicas debidas al cultivo *in vitro* y a los protocolos de conservación más que a cambios genéticos son atribuibles a variaciones epigenéticas por modificaciones en el patrón de metilación del genoma (Peredo *et al.*, 2008; Hao y Deng, 2003; Harding, 1994; Harding, 1991).

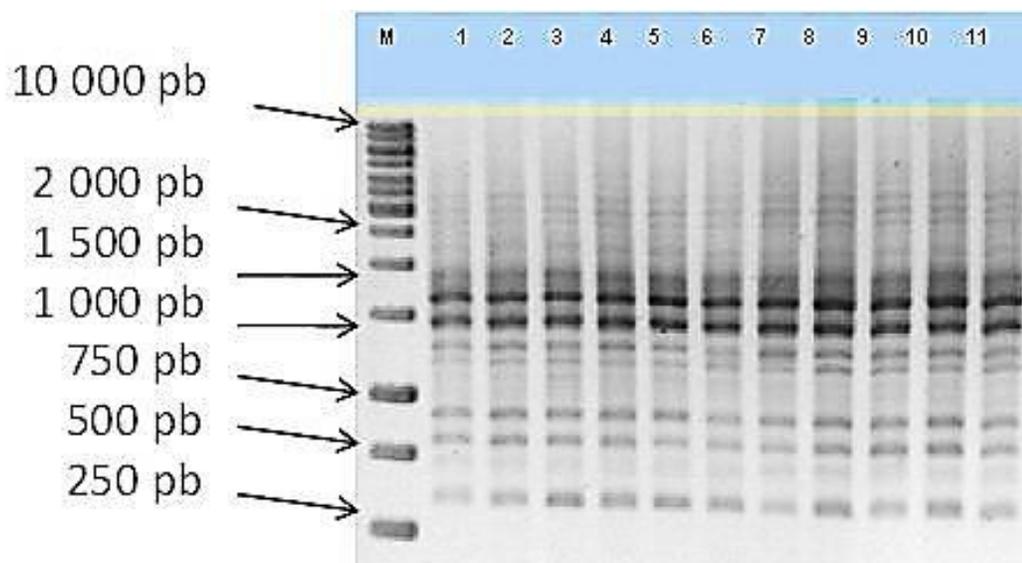


FIGURA 7. Patrón RAPD obtenidos en muestras de ADN de crisantemo con el iniciador ROTH-2, después de 10 meses de conservación en crecimiento lento. Marcador de peso molecular conocido (M; 1 kb Ladder, Fermentas ®). Carriles 1-10 tratamientos correspondientes; carril 11 como control muestra de una planta *in vitro* en condiciones estándar de cultivo.

5.3 Ensayo de conservación de germoplasma de interés

El protocolo que se estableció en éste trabajo para la conservación de crisantemo fue utilizado posteriormente de manera exitosa en la conservación de plántulas de crisantemo de la variedad Hartman y 12 líneas transformadas, de las cuales aquí se reporta la recuperación de la variedad original y de 3 líneas transgénicas (Rd8, Rd10 y Rd18), y además, dos líneas transgénicas de la variedad Indianápolis (35S8 y 35S19)

Para recuperar las plántulas conservadas, y generar más material vegetal, éstas se transfirieron a dos medios diferentes: un medio para inducir brotación (MB), consistente de sales MS con hormonas, AIA 1 mg·litro⁻¹, BAP 3 mg·litro⁻¹ y sacarosa 30 g·litro⁻¹, incubados a 25±1 °C, y un medio MS sin hormonas (MR) que permite la recuperación de los brotes sin que se produzca brotación.

En todos los cultivos en medio MB, se obtuvo un crecimiento calloso que origina numerosos brotes al cabo de 2-3 semanas, que se desarrollaron normalmente, con un buen número de hojas, tallos fuertes y color verde intenso, las diferencias morfológica en las hojas y el número de entrenudos se debe a las características propias de cada línea (Fig.8) .



Figura. 8 Plántulas de crisantemo recuperadas de tratamiento de conservación y cultivadas en medio de inducción de brotación. MS adicionado con AIA 1 mg·litro⁻¹, BAP 3 mg·litro⁻¹ y sacarosa 30 g·litro⁻¹, incubados a 25±1 °C.

VI CONCLUSIONES

Es posible mantener plántulas de crisantemo bajo crecimiento lento en medio MS con 2 ó 4% de sorbitol, a 4°C y luz tenue con fotoperiodo 16/8 h luz/obscuridad por hasta 10 meses, sin cambios genéticos ni pérdidas en la viabilidad del material vegetal.

El mejor tratamiento para la conservación del material vegetal fue la combinación de 2 % sorbitol y 4°C.

La conservación *in vitro* en crecimiento lento es una alternativa práctica para el mantenimiento a mediano plazo, de material con propagación vegetativa como el crisantemo.

VII PERSPECTIVAS

Algunas interrogantes que surgieron en este trabajo que pudieran considerarse en el futuro son:

Probar condiciones de mayor tiempo de almacenamiento, pues es probable que las plántulas soporten mayor tiempo bajo las mejores condiciones probadas en este trabajo.

Los resultados obtenidos generan preguntas interesantes sobre la absorción, asimilación y metabolismo de azúcares como el sorbitol y manitol en el crisantemo, pues parece que de estos dos, solo el sorbitol es asimilado lentamente al metabolismo carbonado de esta especie.

VIII BIBLIOGRAFIA

- Aguayo M.F., D. Ampuero, M. Patricio, et al. Sorbitol dehydrogenase is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 205– 206: 63– 75.
- Anónimo, 2013. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. D.F., México.
- Aynalem, H.M., R. E. Baker and B. M., Reed. 2002. Cold storage of micropropagated Bermudagrass. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*.38:77.
- Azcón B., J. y M. Talón. 2003. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc Graw Hill Interamericana. 3ra edición. España. 522 p.
- Bell, R.L. and B.M. Reed. 2002 *In vitro* tissue culture of pear: advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation. Proceeding of the 8th IS on pear, ActaHort, 596, ISHS, 2002.
- Büttner, M. 2007. The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*
- Ciobanu, I. and D. Constantinovici. 2012. The effect of sorbitol and conservation period on the *in vitro* evolution of *Solanum tuberosum* L. plantlets. *Cercetări Agronomice în Moldova*. 3 (151): 79-86.
- Cruz-Cruz, C.A., M.T. González-Arno and F. Engelmann. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. *Resources*. 2 (2): 73-95.
- Cuenca, B. and A. Vieitez. 2000. Influence of carbon source on shoot multiplication and adventitious bud regeneration in *in vitro* beech cultures. *Plant growth regulation*. 32 (1):1-12.
- Dale, P.J. 1980. A method for *in vitro* storage of *Lolium multiflorum* Lam. *Annals of Botany*: 497-502.
- Dellaporta S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation. *Version II. Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.

- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm—a review. *Euphytica* 57:227-243.
- Engelmann, F. 1998. *in vitro* germplasm conservation. *Acta Horticulturae*. 461:41-48.
- Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. En: Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Engelmann, F. and H. Takagi. (eds.). JP, JIRCAS, Roma, Italia. pp. 8-20.
- Engelmann, F. y M.T. González-Arno. 2013. Introducción a la conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales. In: Crioconservación de Plantas en América Latina y el Caribe. Engelmann, F. y M. T. González-Arno. (eds). San Jose, Costa Rica.: IICA. pp.26-35.
- Ertola, R.J., A.M. Giulietti and F.J. Castillo. 1994. Design, formulation and optimization of media. In: Bioreactors Systems Design. Asenjo J. and J Merchuk (eds.). Marcel Dekker. New York. USA. pp.: 89-137.
- Frensch, J. and T. Hsiao. 1994. Transient Responses of Cell Turgor and Growth of Maize Roots as Affected by Changes in Water Potential Plant Physiol. 104: 247-254.
- Fuentes S., R.L., M.B.P. Calheiros, J. Manetti-Filho, and L.G.E. Vieir. 2000. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant cell, tissue and organ culture*. 60 (1):5-13.
- Fukai, S., T. Nagira and M. Goi. 2000. Cross compatibility between chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) and *Dendranthema* species native to Japan. *Acta Horticulturae*. 508: 337-340.
- Fukai S. 2003. *Dendranthema* species as chrysanthemum genetic resources. *Acta Horticulturae*. 620: 223-240.

- García-Águila, L., M. de Feria y K. Acosta. 2007. Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. *Biotecnología Vegetal*. 7(2): 67 – 79.
- George, E. F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology. Components of culture media.* The Exergetics Ltd. Edington, Wilts. England. pp: 327-574.
- Huják, J. and J. Salak. 2010. Effect of Low Temperatures on the Structure of Plant Cells In: *Handbook of Plant and Crop Stress.* Mohammad Pessarakli (ed.). CRC Press. Third edition. New York. pp. 441- 464.
- Infante G., S. Zárate. 1984. *Métodos Estadísticos. Un enfoque interdisciplinario.* Editorial Trillas. México. 643 pp.
- Kadota, M. and Y. Niimi. 2004. Influences of Carbon Sources and their Concentrations on Shoot Proliferation and Rooting of ‘Hosui’ Japanese Pear. *HORTSCIENCE* 39(7):1681–1683.
- Kanayama Y., H. Mori, H. Imaseki, S. Yamaki. 1992 Nucleotide sequence of a cDNA encoding sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from apple. *Plant Physiology*. 100:1607–1608.
- Karakas, B. 2001. The role of sorbitol synthesis in photosynthesis of peach (*Prunus persica*). PhD dissertation. University of Georgia.
- Keller E.R.J., A. Senula, S. Leunufna and M. Grube. 2006. Slow growth storage and cryopreservation - tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *International Journal of Refrigeration* 29:411-417.
- Krasensky, J. and C. Jonak. 2012. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*. 1-16
- Larkin P. J.; Scowcroft W. R. 1988. Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197– 214.

- Lemoine R, S. La Camera , R. Atanassova, F. Dédaldéchamp, T. Allario, N. Pourtau, J.L. Bonnemain, M.Laloi , P. Coutos-Thévenot, L. Maurousset, M. Faucher , C. Girousse, P. Lemonnier, J. Parrilla, M. Durand. 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science*. 4: 272.
- Liang D., M. Cui, S. Wu, F.-w. Ma. 2012. Genomic Structure, Sub-Cellular Localization, and Promoter Analysis of the Gene Encoding Sorbitol-6-Phosphate Dehydrogenase from Apple. *Plant Molecular Biology Reporter*. 30:904–914
- Loescher W., H. 1987. Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiologia. Plantarum*. 70: 553-557.
- Loescher, W.H., R.H. Tyson, J.D. Everard, R.J. Redgwell and R.L. Bielecki.1992. Mannitol synthesis in higher plants: evidence for the role and characterization of a NADPH-dependent mannose-6-phosphate reductase. *Plant Physiology*. 98: 1396–1402.
- Marín, J.A. 1993. Micropropagación de especies frutales. *Horto Frutic*. 1: 56-62.
- Marin, M.L. and N. Duran-Vila. 1991. Conservation of Citrus germplasm *in vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116:740-746.
- Marino, G., E. Bertazza, Magnanini and A.D. Altan 1993. Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 34:235–244.
- Mello, M.O., C.T.S. Dias, A.F.C. Amaral, M. Melo. 2001. Growth of *Bauhinia forficata* Link, *Curcuma zedoaria* Roscoe and *Phaseolus vulgaris* L. cell suspension cultures with carbon sources. *Scientia Agricola*. 58(3): 481-485.
- Mijangos-Cortés, J. O., N. Santana-Buzzy and L. Latournerie- Moreno. 2010. In: *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán*. Durán R. y M. Méndez (eds). CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA. 496 pp.

- Moreira da Silva, M.H. and P.C. Debergh. 1997. The effect of light quality on the morphogenesis of *in vitro* cultures of *Azorina vidalii* (Wats.) Feer. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 51(3):187-193.
- Nencheva, D. 2010. *In vitro* Propagation of Chrysanthemum. In: *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants*. Jain, S.M., S. Ochatt. (eds.). Humana Press. New York. Pp. 177-185.
- Nodarse, O., I. Santana, M.T. Cornides, Y. Figueredo, E. Héctor. R. Rodríguez. 1998. Comparación de probaciones de caña de azúcar conservadas *in vitro* e *in situ*. Libro de resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones. Ciudad de la Habana.
- Ohta, K. R. Moriguchi, K. Kanahama, S. Yamaki and Y. Kanayama. 2005. Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-Rosaceae plant. *Phytochemistry* 66: 2822–2828.
- Ozudogru, E. A., A. Previati and M. Lambardi. 2010. *In vitro* Conservation and Cryopreservation of Ornamental Plants. In: *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants*. Jain, S.M., S. Ochatt. (eds.). Human Press. New York. pp. 303-324.
- Pua, E.C. and C. Chong. 1984. Requirement for sorbitol (D-glucitol) as carbon source for *in vitro* propagation of *Malus robusta* No. 5. *Canadian Journal of Botany*. 2:1545–1549.
- Pruski, K., T. Kozai, T. Lewis, T. Astatkie and J. Nowak. 2000. Sucrose and light effects on *in vitro* cultures of potato, chokecherry and saskatoon berry during low temperature storage. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 63(3): 215-221.
- Rao, K. N. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*. 3 (2): pp. 136-145.

- Roca, W.M., D.I. Arias, R. Chávez. 1991. Métodos de conservación *in vitro* de germoplasma. Capítulo 31. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Roca, W.M., M. Roginski. (eds.) CIAT. pp. 697-713
- Roca, W. M., R. Escobar, G. Mafla. 1994. Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Principios y técnicas. CIAT, Cali.
- Rout, G. R., A. Mohapatra and S. Mohan. 2006 Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects. *biotechnology Advances*. 24(6):531–560
- Rukundo, P. 2012 Comparative study of effects of table sugar, laboratory grade sucrose and mannitol on growth of banana plantlets under *in vitro* conditions. *Rwanda Journal*. 76 (28): 76-83.
- Rumpho, M., G. Edwards and W. Loescher. 1983. A Pathway for Photosynthetic Carbon Flow to Mannitol in Celery Leaves. *Plant Physiology*. 73: 869-873.
- Stoop, J. and D. Pharr. 1993. Effect of Different Carbon Sources on Relative Growth Rate, Internal Carbohydrates, and Mannitol 1-Oxidoreductase Activity in Celery Suspension Cultures. *Plant Physiol*. 103: 1001-1008
- Stoop, J., J. Williamson, D.M. Pharr. 1996. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends Plant Science* 1: 139–144.
- Salisbury, F. B., C.W. Ross. 1994. *Fisiología Vegetal*. México. Grupo Editorial Iberoamerica. pp: 54-93.
- Sánchez-Chiang, N. y V. M Jiménez. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*. 21 (1): 193-205.
- Scowcroft, W.R. 1984. Genetic Variability in Tissue: Impact on Germplasm Conservation and utilization. Rome: International Board for Plant Genetic Resources. *Agronomía Mesoamericana* 21(1):193-205.
- Soo-Cheon, C. 2013 Influence of carbon sources on shoot organogenesis in *Echinacea angustifolia* DC. *Life Science Journal*. 10(3): 1300-1303.

- Swedlund, B. and R. D. Locy. 1993. Sorbitol as the Primary Carbon Source for the growth of Embryogenic Callus of Maize. *Plant Physiology*. 103: 1339-1346.
- Taylor, P.W.J. and S. Dukin. 1993 Development of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum ssp.* Hybrid germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 34: 217-222
- Teixeira da Silva, J. A. 2004. Ornamental chrysanthemums: improvement by biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 1-18.
- Theocharis, A., C. Clément and E. Barka. 2012. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta* 235:1091–1105.
- Toledo, J., A. Golmirzaie. 1998 Conservación *in vitro* de *Solanum spp.* bajo condiciones de estrés osmótico y ambiental. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. Libro de Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO 98. Junio/1-5. Palacio de Convenciones. Habana. Cuba.
- Weising K.; Nybom H.; Wolff K.; Kahl G. 2005. DNA fingerprinting in plants. Principles , methods and applications. Second edition. CRC Press. 444 pp.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and V.T. Scott. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531–6535.
- Withers, L. 1991. *In vitro* conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*. 43: 3 1-42.
- Zhou R., L.L. Cheng and R. Wayne. 2003. Purification and characterization of sorbitol-6- phosphate phosphatase from apple leaves. *Plant Science*. 165:227–232.