



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

CALLOGÉNESIS *in vitro* EN AMARANTO (*Amaranthus spp*)

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:**

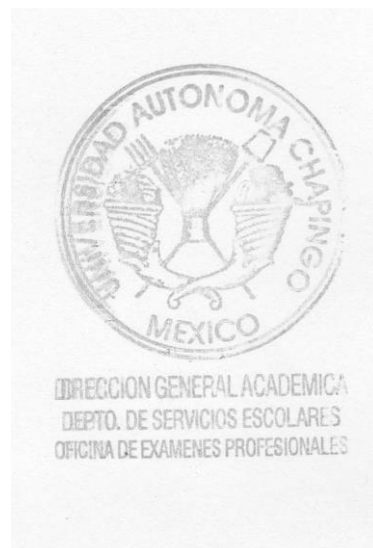
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA

RÍOS PADILLA JOSÉ JUAN

Bajo la dirección de: Dr. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O

Chapingo, Estado de México, junio 2017



CALLOGÉNESIS *in vitro* EN AMARANTO (*Amaranthus spp*)

Tesis realizada por José Juan Ríos Padilla bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

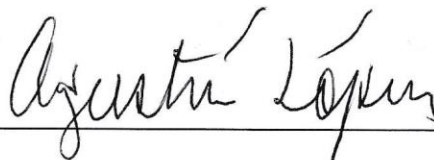
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



Dr. José Luis Rodríguez de la O.

ASESOR:



Dr. Agustín de Jesús López Herrera.

ASESOR:



Dr. José Sergio Barrales Domínguez.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN GENERAL	13
1.1	OBJETIVOS GENERALES	15
1.2	HIPÓTESIS.....	15
2	REVISIÓN DE LITERATURA	16
2.1	Generalidades del género <i>Amaranthus</i>	16
2.2	Generalidades del cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	16
2.2.1	Composición del medio de cultivo	17
2.2.2	Nutrientes minerales.....	18
2.2.3	Sustancias reguladoras del crecimiento.....	19
2.2.4	Otros compuestos.....	22
2.2.5	Control de contaminantes y uso de antioxidantes <i>in vitro</i>	23
2.2.6	Callogénesis	27
2.2.7	Organogénesis	28
2.2.8	Embriogénesis somática	29
2.2.9	Diferenciación y desdiferenciación celular.....	29
2.2.10	Callogénesis en cereales.....	30
2.2.11	Explante	33
2.2.12	Efecto de la luz y la temperatura en la callogénesis	35
3	ARTÍCULO.....	37
4	INTRODUCCIÓN	38
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
5.1	Manejo de los explantes utilizados	41
5.2	Inducción de callo en material vegetal	42
5.3	Ensayo de inducción de callo en embriones maduros	44
5.4	Inducción de callo en embriones maduros	45
5.4.1	Medio de regeneración	45
5.5	Callogénesis en embriones maduros de Amaranto	46

5.5.1	Medios de cultivo	46
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
6.1	Inducción de callo en material vegetal	50
6.2	Ensayo de inducción de callo en embriones maduros	56
6.3	Callogénesis en embriones maduros de Amaranto	57
7	CONCLUSIONES	62
8	BIBLIOGRAFÍA	63
9	ANEXOS	76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Concentraciones y reguladores del crecimiento utilizados en la inducción de callo.	43
Cuadro 2 Concentraciones y reguladores del crecimiento utilizados en la inducción de callo.	44
Cuadro 3 Tratamientos, concentraciones y reguladores empleados.	45
Cuadro 4 Composición de los medios de cultivo.	46
Cuadro 5 Tratamientos, concentraciones de maltosa y glucosa.....	47
Cuadro 6 Clases texturales definidas para la toma de datos característicos en callos.....	48
Cuadro 7 Escala de colores definida para la toma de datos característicos en callos.....	49
Cuadro 8 Cuadrados medios del análisis de varianza del efecto de variedades, reguladores del crecimiento y tipo de explantes sobre el peso de callo en amaranto.....	51
Cuadro 9 Comparación de medias del efecto de regulador del crecimiento, variedades, explantes y concentración de regulador en el peso de callo.	52
Cuadro 10 Cuadrados medios del análisis de varianza del efecto de variedades, reguladores del crecimiento y tipo de explantes sobre la regeneración de callos de amaranto.....	54
Cuadro 11 Comparación de medias del efecto de variedades, explantes y concentración de TDZ en el peso de callo.	55
Cuadro 12 Resultados correspondientes al porcentaje de inducción de callo. .	57
Cuadro 13 Cuadrados medios del análisis de varianza del efecto de la concentración de maltosa y glucosa (fuentes de carbono) sobre inducción de callos en amaranto.....	57
Cuadro 14 Comparación de medias del efecto de la concentración de maltosa y glucosa en el peso de callos, medio de inducción.	58
Cuadro 15 Comparación de medias del efecto de la concentración de maltosa y glucosa en el peso de callos, medio de desdiferenciación.	59
Cuadro 16 Comparación de medias del efecto de la concentración de maltosa y glucosa en el peso de callos, medio de regeneración.	60
Cuadro 17 Composición mineral de los medios de cultivo más utilizados.	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Plántulas de amaranto 10 días después de la siembra.	41
Figura 2 Clases texturales para caracterizar los callos obtenidos a partir de embriones maduros de semillas de amaranto. A) suave acuoso, b) friable, c) envuelto en mucilago, d) semicompacto, con pigmento clorofílico, e) compacto duro.....	48
Figura 3 Escala de colores definida para caracterizar los callos obtenidos a partir de embriones maduros de semillas de amaranto. A) amarillo, b) cremoso traslucido, c) amarillo cafésoso, d) verde clorofílico.....	49
Figura 1 Frecuencia de formación de callo utilizando dos reguladores del crecimiento a cuatro niveles cada uno.....	50
Figura 2 Características de los callos obtenidos en medio de cultivo ms suplementado con 2,4-d (3 sds*) a) segmentos de tallo 0.0 mg l ⁻¹ (5 sds) b) yemas axilares 3.0 mg l ⁻¹ (8 sds) c) mesófilo de hoja 3.0 mg l ⁻¹ , crecidos en oscuridad a una temperatura de 27 °c.*semanas después de la siembra.....	54
Figura 3 Callo embriogénico, proveniente de mesófilo de hoja de plántulas de amaranto variedad 'arely', crecido en luz y medio de cultivo ms suplementado con tdz (10 mg l ⁻¹), tres semanas después del subcultivo.	56
Figura 4 Características de la línea 'pq2' a) semilla de amaranto hidratada, b) extracción del embrión, se observan lo cotiledones del mismo, c) formación de callo, crecido en oscuridad (27 °c) en medio ms dos semanas después de la siembra.	57
Figura 5 Gráficos de frecuencia para la variable color, el regulador del crecimiento es 2,4-d los tipos de callo son 1 = amarillo; 2 = cremoso traslúcido, 3 = amarillo cafésoso; 4 = verde clorofílico.	77
Figura 6 Gráficos de frecuencia para la variable textura, el regulador del crecimiento es 2,4-d los tipos de callo son 1 = suave acuoso; 2 =friable, 3 = envuelto en mucílago; 4 =semicompacto; 5 = compacto duro.	78
Figura 7 Gráficos de frecuencia para la variable color, el regulador del crecimiento es tdz los tipos de callo son 1 = amarillo; 2 = cremoso traslúcido, 3 = amarillo cafésoso; 4 = verde clorofílico.	79
Figura 8 Gráficos de frecuencia para la variable textura, el regulador del crecimiento es tdz los tipos de callo son 1 = suave acuoso; 2 =friable, 3 = envuelto en mucílago; 4 =semicompacto; 5 = compacto duro.....	80
Figura 9 Gráficos de frecuencia para la variable color, el regulador del crecimiento es tdz los tipos de callo son 1 = amarillo; 2 = cremoso traslúcido, 3 = amarillo cafésoso; 4 = verde clorofílico.	81

Figura 10 Gráficos de frecuencia para la variable textura, el regulador del crecimiento es tdz los tipos de callo son 1 = suave acuoso; 2 = friable, 3 = envuelto en mucílago; 4 = semicompacto; 5 = compacto duro.....	82
Figura 11 Gráfico de frecuencia para la variable color, diferentes concentraciones de fuente de carbono los tipos de callo son 1 = amarillo; 2 = cremoso traslúcido, 3 = amarillo cafésoso; 4 = verde clorofílico; conc1= 40 mg l ⁻¹ maltosa y 10 mg l ⁻¹ glucosa; conc2=30 mg l ⁻¹ maltosa y 7.5 mg l ⁻¹ glucosa; conc3=20 mg l ⁻¹ maltosa y 5 mg l ⁻¹ glucosa.....	83
Figura 12 Gráfico de frecuencia para la variable textura, diferentes concentraciones de fuente de carbono los tipos de callo son 1 = suave acuoso; 2 = friable, 3 = envuelto en mucílago; 4 = semicompacto; 5 = compacto duro; conc1= 40 mg l ⁻¹ maltosa y 10 mg l ⁻¹ glucosa; conc2=30 mg l ⁻¹ maltosa y 7.5 mg l ⁻¹ glucosa; conc3=20 mg l ⁻¹ maltosa y 5 mg l ⁻¹ glucosa.....	83
Figura 13 Gráfico de frecuencia para la variable color, diferentes concentraciones de fuente de carbono los tipos de callo son 1 = amarillo; 2 = cremoso traslúcido, 3 = amarillo cafésoso; 4 = verde clorofílico; conc1= 40 mg l ⁻¹ maltosa y 10 mg l ⁻¹ glucosa; conc2=30 mg l ⁻¹ maltosa y 7.5 mg l ⁻¹ glucosa; conc3=20 mg l ⁻¹ maltosa y 5 mg l ⁻¹ glucosa.....	84
Figura 14 Gráfico de frecuencia para la variable textura, diferentes concentraciones de fuente de carbono los tipos de callo son 1 = suave acuoso; 2 = friable, 3 = envuelto en mucílago; 4 = semicompacto; 5 = compacto duro; conc1= 40 mg l ⁻¹ maltosa y 10 mg l ⁻¹ glucosa; conc2=30 mg l ⁻¹ maltosa y 7.5 mg l ⁻¹ glucosa; conc3=20 mg l ⁻¹ maltosa y 5 mg l ⁻¹ glucosa.....	84
Figura 15 Gráfico de frecuencia para la variable color, diferentes concentraciones de fuente de carbono los tipos de callo son 1 = amarillo; 2 = cremoso traslúcido, 3 = amarillo cafésoso; 4 = verde clorofílico; conc1= 40 mg l ⁻¹ maltosa y 10 mg l ⁻¹ glucosa; conc2=30 mg l ⁻¹ maltosa y 7.5 mg l ⁻¹ glucosa; conc3=20 mg l ⁻¹ maltosa y 5 mg l ⁻¹ glucosa.....	85
Figura 16 Gráfico de frecuencia para la variable textura, diferentes concentraciones de fuente de carbono los tipos de callo son 1 = suave acuoso; 2 = friable, 3 = envuelto en mucílago; 4 = semicompacto; 5 = compacto duro; conc1= 40 mg l ⁻¹ maltosa y 10 mg l ⁻¹ glucosa; conc2=30 mg l ⁻¹ maltosa y 7.5 mg l ⁻¹ glucosa; conc3=20 mg l ⁻¹ maltosa y 5 mg l ⁻¹ glucosa.....	85

ABREVIATURAS

ABREV.	SIGNIFICADO	ABREV.	SIGNIFICADO
μl	Microlitro	mg	Miligramo
μM	Micromolar	mM	Micromolar
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	ng	Nanogramo
2iP	2-isopentil-adenina	pCPA	Ácido p-clorofenoxiacético
a.C.	Antes de cristo	pH	Potencial de hidrógeno
ADN	Ácido desoxirribonucleico	RRC	Rodale Research Center
AIA	Ácido indol-3-acetico	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
AIB	Ácido indolbutírico	TDZ	Tidiazurón
ANA	Ácido α-naftalenacético	Zea	Zeatina
BA	Bencil-adenina		
BTOA	Ácido benzotiazol-2-oxiacético		
CPPU	Cloropiridilfenilurea		
d.C.	Después de cristo		
DPU	Difenilurea		
<i>et al.</i>	Y otros		
g	Gramo		
GA _s	Giberelinas		
<i>In vitro</i>	En vidrio		
Ítems	Rubros		
Kin	Cinetina		

DEDICATORIA

A mis padres Sr. Fidel Ríos Díaz y Sra. Elvira Padilla Martínez, al final de esta etapa de mi vida no encuentro la forma de agradecer todo lo que han hecho por mí, gracias por darme la vida, por enseñarme a trabajar para cumplir mis metas, por su apoyo incondicional, sus regaños, ejemplo, amor y confianza; a ustedes que fueron testigos del camino andado para llegar hasta aquí y porque sé que mi sueño era el suyo también; sepan que todo eso estimuló la fuerza que me impulsó a alcanzarlo. El logro hoy cumplido es también de ustedes resultado de sus esfuerzos, sacrificios y tiempo invertido en mí.

A mis hermanos Marcela, Angélica, Erika, Olga, Fidel, Fidencio y Pilar por su apoyo incondicional en la realización de mis estudios y por estar al pendiente de cada paso que doy en la vida.

A mi hermana Alejandra Ríos Padilla quien ha sido el motor que me impulsa para cumplir cada meta en mi vida académica y profesional, por haberme dado una hermosa sobrina para la cual espero ser un ejemplo de superación.

A mi sobrina Marbey Estefanía Mayoral Ríos, eres la persona que más admiro por tu fortaleza y madurez a pesar de tu corta edad, el ejemplo más tangible de superación y esfuerzo, jamás me cansaré de agradecer a la vida el tenerte como amiga, consejera y motivo de alegría.

FRATERNALMENTE, JUAN.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente al CONACyT por la beca otorgada durante los últimos dos años para llevar a cabo mis estudios de Maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo por haberme permitido llevar a cabo mis estudios de posgrado, así como la realización de esta investigación. De igual manera al Posgrado en Horticultura por haberme aceptado para formar parte de su matrícula y brindarme las herramientas necesarias para cumplir mis objetivos.

Quiero hacer un agradecimiento especial al Dr. José Luis Rodríguez de la O por su dirección en la realización de esta investigación pero sobre todo por brindarme sus conocimientos y gran experiencia científica.

Me es grato darle las gracias al Dr. Agustín de Jesús López Herrera y al Dr. José Sergio Barrales Domínguez por haber aceptado formar parte de mi comité asesor, su disponibilidad y valiosos consejos emitidos para mejorar ésta investigación.

Por último y con un inmenso afecto agradezco a mis mejores amigos César Ramos Hernández, David Morales Sandoval y Mariela Anelí Hernández Coutiño quienes con su alegría, compañía, apoyo y sugerencias engrandecieron éste trabajo. A la familia Romero Bautista integrada por Sr. Loreto Alfredo Romero Romero, Sra. Martha Beatriz Bautista Hernández, Cindy Romero Bautista, Xenia Arlette Del rio Romero y especialmente a Iván Romero Bautista por recibirme en su hogar como un integrante más de su familia y apoyarme de manera incondicional en la realización de mis estudios de posgrado.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de la presente tesis es originario de Cocinillas Apan, Hidalgo, el 11 de septiembre de 1990. Cursó sus estudios de licenciatura en la Universidad Autónoma Chapingo en el periodo 2009 - 2014, obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Suelos en el año 2014. Durante los años 2015 - 2016 cursó la Maestría en Ciencias en Horticultura en la Universidad Autónoma Chapingo, obteniendo el grado en el año 2017.

CALLOGÉNESIS *IN VITRO* EN AMARANTO (*Amaranthus spp*)

IN VITRO CALLOGENESIS IN AMARANTH (*Amaranthus spp*)

José Juan Ríos Padilla¹, José Luis Rodríguez de la O¹, Agustín de Jesús López Herrera¹, José Sergio Barrales Domínguez¹

RESUMEN GENERAL

El amaranto es un cultivo marginal en México con apenas 2000 ha, que por su alta calidad de proteína así como aminoácidos esenciales, deficientes en otros granos tiene perspectivas de desarrollo tanto en México como en el mundo, además tiene otros usos como arvense, forraje, esquileo u ornamental. El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una técnica comúnmente utilizada que se basa en organogénesis a través de callos embriogénicos somáticos los cuales pueden ser obtenidos a partir de diferentes tipos de explantes. Sin embargo, se ha observado que la obtención de callos embriogénicos con posibilidad de regeneración en plantas funcionales son respuestas dependientes del tipo y concentración de regulador de crecimiento empleado así como de la fuente de carbono. El objetivo del presente trabajo fue identificar las condiciones de cultivo *in vitro* necesarias para obtener callo embriogénico a partir de mesófilo de hoja, tallo, yema axilar y embriones maduros de tres variedades de amaranto pertenecientes a las especies *Amaranthus hypochondriacus* L. de las cuales no se encontró reportes de haberse utilizado en cultivo de tejidos. Utilizando el medio de cultivo de inducción de callo suplementado con 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D para explantes de mesófilo de hoja, se obtuvieron callos embriogénicos con una frecuencia de inducción de 90 % en comparación con la frecuencia de inducción usando como explantes embriones maduros que fue de 96 % en el medio suplementado con 20 mg L⁻¹ de maltosa y 5 mg L⁻¹ de glucosa estos resultados se refieren a los mejores tratamientos cuyos callos presentaron un color cremoso translucido y/o verde clorofílico además de una consistencia friable y semicompacta ($P \leq 0.05$) características que se consideran óptimas para la obtención de callos embriogénicos con posibilidad de regeneración en plantas completas o funcionales.

PALABRAS CLAVE: *Amaranthus hypochondriacus* L., Embrión maduro, Mesófilo de hoja, Callo embriogénico

GENERAL ABSTRACT

Amaranth is a marginal crop in Mexico with only 2000 ha, which because of its high quality of protein as well as essential amino acids, deficient in other grains has prospects for development both in Mexico and in the world, in addition to other uses such as arvense, fodder or ornamental crop. *In vitro* culture of plant tissues is a commonly used technique that is based on organogenesis through somatic embryogenic calli which can be obtained from different types of explants. However, it has been observed that the production of embryogenic callus with possibility of regeneration in functional plants is a response dependent on the type and concentration of growth regulator used as well as the carbon source. The objective of this study was to identify the *in vitro* culture conditions necessary to obtain embryogenic callus from leaf mesophyll, stem, axillary bud and mature embryos of three varieties of amaranth belonging to the species *Amaranthus hypochondriacus* L. of which there were no reports of their prior use in tissue culture. Using the callus induction culture medium supplemented with 3.0 mg L⁻¹ 2,4-D for leaf mesophyll explants, embryogenic calli were obtained with an induction frequency of 90 % compared to the induction frequency using explants mature embryos which was 96 % in the medium supplemented with 20 mg L⁻¹ maltose and 5 mg L⁻¹ glucose these results refer to the best treatments whose calli presented a translucent creamy color and/or chlorophyll green in addition to a friable and semicompact consistency ($P \leq 0.05$) that is considered optimal for the production of embryogenic calli with possibility of regeneration in complete or functional plants.

KEYWORDS: *Amaranthus hypochondriacus* L., mature embryo, Leaf mesophyll, Embryogenic callus.

¹Programa de Maestría en Ciencias en Horticultura. Instituto de Horticultura y Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Edo. de México. CP 56230.

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El amaranto (*Amaranthus spp*) es un cultivo marginal en México con apenas 2000 ha (Arellano, 2001), que por su alta calidad de proteína en el grano tiene perspectivas de desarrollo, tanto en México (Soriano, 1993) como en el mundo (Breene, 1991; Wu *et al.*, 2000). El género incluye aproximadamente 60 especies, algunas de ellas han sido cultivadas por más de 5,000 años para cosechar sus granos o utilizar sus partes vegetativas ya sea como arvense, forraje u ornamental.

Las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* han sido una herramienta valiosa para el desarrollo de protocolos de regeneración; además se han usado en programas de mejoramiento o transformación genética en diferentes especies de pastos, caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.), maíz (*Zea mayz* L.) y arroz (*Oryza sativa* L.) entre otros. (Aguado-Santacruz *et al.*, 2001).

Frecuentemente, los factores genotipo, medio de cultivo, fuente de auxinas, concentración, fuente de carbono (Rakshit *et al.*, 2010), tipo de explante y edad (Aina *et al.*, 2012), son considerados en la inducción de callos morfogénicos para incrementar la respuesta de regeneración de plantas morfológicamente normales. Se ha reportado alta eficiencia en la inducción de callos en diferentes explantes, pero la capacidad de regeneración ha sido muy pobre (Hu *et al.*, 2006; Bernal-Flores *et al.*, 2013), capacidad que constituye la principal limitante para la obtención de protocolos eficientes de mejoramiento vegetal.

Aunque la variabilidad genética es esencial para la creación de plantas con características agronómicas superiores, las mutaciones espontáneas ocurren con una frecuencia extremadamente baja; por esta razón las técnicas de inducción de callo *in vitro* constituyen una potente herramienta para lograr un rápido incremento en la variabilidad genética de las especies cultivadas (Okole *et al.*, 2000).

En general, el tejido más ampliamente usado para la selección es el callo, aunque pueden utilizarse también otros explantes que conducen a una organogénesis directa. El callo tiene la ventaja de ser producido fácilmente y de que puede regenerarse potencialmente en plántulas. Además, la carencia de cutícula facilita la toma de moléculas pequeñas tales como las fitotoxinas (Okole *et al.*, 2000).

En este procedimiento la presión de selección puede ser aplicada a un número de células considerable, evitando la selección de plantas individuales en pruebas de campo convencionales. El agente de selección puede ser de origen biótico o abiótico (metales pesados, sales, herbicidas, fitotoxinas, virus, entre otros.), de acuerdo con los fines que se persigan (Lestari, 2006).

Considerando lo anterior y tomando en cuenta la importancia nutrimental, ornamental y puesto que la investigación *in vitro* sobre este género ha sido escasa, el objetivo de ésta fue obtener un protocolo de inducción a callo *in vitro* con la finalidad de caracterizarlos físicamente suponiendo la ocurrencia de posibles cambios fenotípicos (en posteriores investigaciones) en pro del incremento en el potencial económico de la especie.

1.1 OBJETIVOS GENERALES

Obtener un protocolo de inducción a callo *in vitro* a partir de explantes de Amaranto (*Amaranthus spp*).

Evaluar físicamente los callos obtenidos en relación con las características propias del medio de cultivo en el cual fueron sembrados.

Comparar la formación de callo con base en el explante utilizado en el cultivo *in vitro*.

1.2 HIPÓTESIS

Se considera posible obtener las condiciones necesarias para la obtención de callo embriogénico *in vitro* a partir de explantes de amaranto *Amaranthus spp*.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del género *Amaranthus*

Varios autores (Merrill, 1950; de Candolle, 1983; Hooker, 1885) indicaron que las especies del género *Amaranthus* han sido cultivadas desde tiempos inmemoriales en el Sur de Asia y probablemente son originarias de este lugar, sin embargo, no existen muchas evidencias que respalden esta afirmación.

Las evidencias arqueológicas encontradas confirman el origen americano de las especies cultivadas, ya que, las hojas y semillas del género *Amaranthus* fueron utilizadas por los habitantes de América Prehistórica, mucho antes del proceso de domesticación de estas plantas (Sauer, 1967) *Amaranthus hypochondriacus* L. es otra importante especie para producción de panojas, hojas y raíz siendo originaria de México, ya que aquí se le cultivaba desde el tiempo de los aztecas, actualmente se sigue cultivando y se encuentra ampliamente distribuída en México; también se cultiva en los Himalayas en Nepal y en el sur de la India donde se han formado centros secundarios de diversificación.

Los probables progenitores silvestres de las especies cultivadas presentan intervalos de distribución muy amplios en América tropical y templada. Sin lugar a dudas sin ser miembros de la vegetación del matorral de la región semidesértica de Tehuacán, debieron de haber estado presentes en el valle en tiempos aborígenes como pioneras de márgenes de ríos o como malezas en campos irrigados (Sauer, 1969).

2.2 Generalidades del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos, en su acepción amplia, puede ser definido como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal que pueden ser protoplastos, células desprovistas de pared celular, células, tejidos u órganos) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (George, 1993). La imprecisión de esta definición puede generar muchas polémicas, pero es actualmente aceptada.

Generalmente es común dividir las técnicas del cultivo de tejidos en dos grandes grupos: a) cultivos en medios semisólidos y b) cultivos en medios líquidos, los que a su vez pueden ser agitados (mediante el empleo de agitadores de uso continuo) o estacionarios (Posposilova *et al.*, 1999).

También es frecuente dividir al cultivo de tejidos atendiendo a los niveles de complejidad en cultivo de órganos, cultivos celulares y cultivo de protoplastos. Para el establecimiento de los cultivos utilizando cualquiera de los sistemas es necesario tener en cuenta algunos aspectos generales comunes relacionados con el explante, la asepsia, el medio de cultivo y las condiciones de incubación (Pérez, 1998).

2.2.1 Composición del medio de cultivo

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos (Torres *et al.*, 1998).

Básicamente, los medios de cultivo se componen de compuestos que suministran:

- 1) Una fuente de carbono
- 2) Nutrientes minerales
- 3) Sustancias reguladoras del crecimiento
- 4) Agente gelificante
- 5) Otros compuestos (Anexo 1)

Fuente de carbono: Prácticamente todos los cultivos son heterótrofos (comparativamente unos pocos son autótrofos) y por ende necesitan del suministro de una fuente de carbono. La sacarosa, en concentraciones de 2 al 5 %, es el azúcar más utilizado. En algunos medios se le reemplaza por glucosa. En casos particulares se cita el empleo de maltosa o galactosa (Hurtado & Merino, 1991).

Furter *et al.* (2000), probaron la interacción entre concentraciones de fuentes de carbono, observando que las plantas varían en su respuesta a las fuentes de hidratos de carbono con porcentajes de callogénesis entre 0 a 18 %. Los resultados obtenidos indicaron que puede ser necesario perfeccionar el procedimiento para cada genotipo de interés, a fin de obtener mejores resultados.

También mioinositol (100 mg L^{-1}) suele ser incorporado a los medios dando como resultado un mejor crecimiento de los cultivos.

Se conoce que muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos y por lo tanto, es necesario agregar al medio una fuente de carbono (Roca & Mroginski, 1991).

Jones (1974), citado por Orellana (1998) señala que algunas veces es posible restaurar el potencial embriogénico de los cultivos, incrementando la concentración de sacarosa o como lo recomienda Reinert (1973), citado por Orellana (1998), alterando las proporciones de nitrógeno y de auxinas.

Por lo general las plantas cultivadas *in vitro* no realizan fotosíntesis debido a la baja intensidad de luz en que se desarrollan y aunque lo hagan producirán muy poco azúcar (Usue *et al.*, 1996).

Lassaga (2002) mencionó que cuando se utiliza como fuente de carbono glucosa o maltosa en el cultivo *in vitro*, el desarrollo del calo es mayor, el porcentaje de enraizamiento es más alto, así como la longitud y número de raicillas.

2.2.2 Nutrientes minerales

Los medios de cultivo deben suministrar los mismos macro y micronutrientes que son esenciales para el crecimiento de las plantas enteras. En general se destacan las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio (Roca & Mroginski, 1993).

El nitrógeno es suministrado en forma de amonio y/o nitrato. También se pueden utilizar urea, glutamina y caseína hidrolizada. Es fundamental que el hierro sea

incorporado juntamente con un agente quelante (Na_2EDTA), lo que lo hace disponible es un amplio rango de pH (Torres *et al.*, 1998).

De todas las vitaminas que comúnmente se incorporan a los medios, pareciera que la tiamina es la única realmente imprescindible para el buen crecimiento de los cultivos (Roca & Mroginski, 1993).

2.2.3 Sustancias reguladoras del crecimiento

Los reguladores del crecimiento vegetal son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones internas, cercanas a 1 mM (Hurtado & Merino, 1991).

A medida que se fueron identificando un mayor número de reguladores de crecimiento y se fueron estudiando sus efectos y concentraciones endógenas se hizo evidente que cada uno de ellos no sólo influye en las respuestas de muchas partes del vegetal, sino que tales respuestas dependen de la especie, del órgano del vegetal, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones entre reguladores de crecimiento y de diversos factores ambientales. Por lo tanto es riesgoso generalizar acerca de los efectos de los reguladores de crecimiento sobre los procesos de crecimiento y desarrollo en un tejido u órgano vegetal en particular (Salisbury & Ross, 1994).

Los reguladores del crecimiento que resultan útiles para el establecimiento y crecimiento de los cultivos de tejidos vegetales como así también para la producción de metabolitos se agrupan en varias categorías, de acuerdo a su estructura, tal como se describe en los ítems siguientes.

2.2.3.1 Auxinas

Es una familia de sustancias químicas que tienen en común la capacidad de regular el crecimiento, la división celular y la diferenciación de raíces en los cultivos *in vitro*. En las plantas, las auxinas intervienen en el tropismo a la gravedad y a la luz, la dominancia apical, el crecimiento de las partes florales y la diferenciación de los tejidos vasculares. Las auxinas más utilizadas son el AIA

(ácido indol-3-acético), el ANA (ácido α -naftalenacético), el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), el AIB (ácido indolbutírico), el pCPA (ácido p-clorofenoxiacético) y el BTOA (ácido benzotiazol-2-oxiacético) (Davies, 1995).

En cuanto al mecanismo de acción de las auxinas, se conoce que ellas aumentan la plasticidad de la pared celular, lo que permite la expansión de la célula (Abel & Theologis, 1996). La elongación inducida por auxinas se inicia al unirse esta hormona al receptor, probablemente localizado en la cara externa de la membrana plasmática, lo que desencadena una cascada de eventos que determinan la secreción de protones por la célula. Como resultado de esta acidificación, se activan proteínas que rompen los enlaces cruzados entre las moléculas de celulosa y permiten la elongación cuando aumenta la presión de turgencia. Durante este proceso se han detectado cambios en las concentraciones del trifosfato de inositol y del calcio iónico citoplasmático, los que actuarían como segundos mensajeros (Cleland, 1995).

2.2.3.2 Citocininas

Son derivados de la adenina que promueven la división celular. Entre ellas cabe mencionar las siguientes: BA (bencil-adenina), K (cinetina o 6-furfuril aminopurina), Zea (zeatina) y 2-iP (N-isopentenil adenina). Las dos primeras son citocininas sintéticas y las dos últimas naturales (Salisbury & Ross, 1994).

La eficiencia comparativa de dos citocininas (BA y 2iP) en igual concentración sobre la propagación *in vitro* fue estudiada por Bouza *et al.* (1993). Los explantos cultivados en BA desarrollan nuevas hojas y yemas axilares asegurando una buena multiplicación vegetativa, mientras que el desarrollo de los explantes cultivados en 2iP fue escaso. Las respuestas anteriores fueron correlacionadas con los niveles endógenos de AIA y ABA (ácidos abscísico), observando que altas concentraciones de BA se asociaron con baja producción de AIA y que el ABA se produce más tardíamente en los explantes tratados con BA que en los cultivados con 2iP. Estos resultados indican que un mismo tejido reacciona de modo diferente ante el estímulo hormonal, aun cuando se trate de compuestos relacionados.

La inclusión de citocininas en el medio de cultivo permite formar callos en varias especies vegetales, aunque principalmente induce que regiones meristemáticas multicelulares se diferencien en estructuras organizadas.

La proporción entre auxinas y citocininas permite regular la organogénesis o la dediferenciación, por lo que se deben programar las concentraciones de auxinas y citocininas a través de diseños factoriales para cada especie y variedad vegetal y según el objetivo del trabajo. En general, cuando la relación auxina/citocinina es alta se forman raíces, cuando es baja se producen vástagos y con relaciones cercanas a 1 se producen callos (Krikorian, 1995).

Además de las citocininas derivadas de adenina, se han detectado una serie de fenilureas sustituidas que tienen similar actividad y son utilizados como citocininas en algunos protocolos de cultivo de tejidos vegetales (Krikorian, 1995; Christianson & Hornbuckle, 1999). Tales compuestos son el tidiazurón (TDZ), la N, N'-difenilurea (DPU) y la cloropiridilfenilurea (CPPU).

El hecho que no se hayan obtenido mutantes de ninguna especie vegetal que sean auxina o citocininodeficientes indica que estos dos reguladores de crecimiento son indispensables para el crecimiento vegetal, lo que llevó a Gray y Estelle (1998) a postular que tales mutantes serían embriogénica y/o gametofíticamente letales.

2.2.3.3 Giberelinas

Las giberelinas (GAs) constituyen una familia de compuestos químicos tetracíclicos diterpenoides que regulan varios procesos del crecimiento y desarrollo como la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración (Gray & Estelle, 1998).

Se han identificado 64 GAs exclusivos de plantas superiores, 12 GAs que están presentes sólo en hongos del género *Gibberella* y 13 tipos de GAs que se aíslan de ambos grupos. Tanto en *Gibberella* como en angiospermas se han aislado varios tipos de GAs simultáneamente (Sponsel, 1995).

Los variados efectos de las giberelinas sugieren que tienen más de un sitio de acción primario. Así, si sólo se considera la elongación del tallo en plantas completas, ésta es el resultado de al menos tres acontecimientos coadyuvantes, a) Estímulo de la división celular de las células meristemáticas del ápice del tallo, b) Promoción de la hidrólisis de almidón, fructanos y sacarosa originando monosacáridos que proporcionen energía vía respiración, contribuyan a la formación de la pared celular y disminuyan el potencial hídrico de la célula y c) Incremento de la plasticidad de la pared celular, permitiendo la elongación celular (Salisbury & Ross, 1994).

A pesar de la gran cantidad de efectos fisiológicos de las GAs, su uso en los medios de cultivo no está muy difundido. En algunos casos, como en cultivos de zanahoria, se ha demostrado que el GA₃ afecta más la división que el crecimiento celular (Krikorian, 1995). En cultivos productores de metabolitos secundarios puede afectar la producción tanto en los niveles como en su concentración relativa; tal es el caso de los cultivos de raíces transformadas de *Brugmansia candida*, en los cuales el suplemento de GA₃ reduce la acumulación de alcaloides del tropano y altera significativamente la concentración relativa (Salisbury & Ross, 1994).

Agente gelificante: El agar (entre 0.6 y 1 %) es el compuesto más utilizado. También pueden emplearse Agargel (0.40 – 0.60 %), Transfergel (2.0 – 2.60 %), Phytigel (0.25 – 0.40 %), agarosa (0.80 - 0.90 %) y Gelrite (0.10 – 0.20 %).

2.2.4 Otros compuestos

Muchas sustancias, de variada composición química, suelen ser adicionadas a los medios básicos. Además de la glicina, otros aminoácidos se pueden agregar a los medios. Es el caso de L-tirosina, asparagina y cisteína, aunque hay que tener presente que en dosis altas pueden inhibir el crecimiento de los cultivos. El carbón activado (0.1 a 5 %) suele ser incorporado al medio, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos.

En algunos medios se incorporan ácidos orgánicos como el málico, el cítrico, el pirúvico y el succínico y es frecuente el empleo de L-glutamina y de caseína hidrolizada. Aún hoy se siguen utilizando ciertos componentes de composición química no bien definida como el agua de coco (5 a 15 %), jugo de tomate y puré de banana (Usue *et al.*, 1996).

2.2.5 Control de contaminantes y uso de antioxidantes *in vitro*

La contaminación por microorganismos es la causa más importante de pérdidas en laboratorios comerciales y de investigación de cultivo de células y tejidos vegetales (Leifert & Cassells, 2001). Sin embargo, en las compañías comerciales la severidad e implicaciones del problema no se reconocen o admiten y muchos laboratorios científicos dejan de registrar los índices de contaminación. Los laboratorios para la micropropagación comercial de plantas a menudo solo reconocen las fuentes de introducción de microorganismos después que han ocurrido grandes pérdidas. La incapacidad de reducirlas a un nivel que permita un rendimiento productivo predecible y se revierta en calidad de las plantas micropropagadas llevó, al menos parcialmente, a una disminución seria del número de estos en la década de los 90 (Leifert & Woodward, 1998).

Una amplia variedad de microorganismos como hongos filamentosos, levaduras, bacterias, virus y viroides que se consideran patógenos o no de las plantas cultivadas en condiciones naturales han sido identificados como contaminantes *in vitro*. Los mismos pueden ser introducidos con el explante inicial, durante las manipulaciones en el laboratorio (Leifert & Cassells, 2001). Entre ellos, las bacterias han sido consideradas como las que causan los daños más serios. Algunas especies tienen la capacidad de manifestar crecimiento en los medios de cultivo inmediatamente, pero otras permanecen latentes por largos períodos en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y después que han incrementado su número en el interior del tejido vegetal o las condiciones del cultivo *in vitro* lo permiten, aparecen súbitamente y pueden conllevar a pérdidas de más del 20.0 % (Cassells, 1991; George, 1993).

Leifert *et al.* (1994) consideraron que el pH podía ser uno de los factores responsables por la presencia de distintas comunidades de bacterias sobre diferentes especies de plantas cultivadas *in vitro* aunque parecía improbable que fuera el único. Ellos comprobaron que las plantas pueden hacer variar el pH inicial de los medios de cultivo de 5.5 - 5.8 a valores que van desde 3.8 a 6.3 durante su crecimiento y esto puede contribuir o inhibir el desarrollo de las bacterias o ejercer un efecto selectivo sobre los grupos bacterianos que pueden crecer en estos medios.

El tamaño del explante es otra de las causas que incrementa la presencia de contaminantes *in vitro*, pues mientras mayor sea el explante, más difícil es de desinfectar (Surga & Guevara, 1994). Del mismo modo, las irregularidades ubicadas en la superficie del explante afectan el éxito de la desinfección superficial ya que pueden servir de depósito de esporas y polvo, y los productos empleados no logran llegar y desinfectar las áreas de interés (Roca & Mrogrinski, 1993; Ramírez *et al.*, 2000).

El éxito de los sistemas de propagación de plantas por biotecnología depende en gran medida del control y la prevención de la contaminación microbiana (Alvarado, 1998). Existen varias estrategias para controlar y manejar la contaminación, que incluyen la prevención mediante la selección y el tratamiento de la planta madre, la desinfección superficial del explante y la identificación de los microorganismos contaminantes, el control de la contaminación a través del uso de sustancias antimicrobianas y el cultivo de meristemos (Niedz & Bausher, 2002).

En plantas de cereales donantes más del 50 % de los hongos filamentosos que conformaban su micobiota fue eliminado con la aplicación de fungicidas comerciales, combinando fungicidas preventivos de contacto Mancozeb (10 g L^{-1}) y oxícloruro de cobre (10 g L^{-1}) con fungicida curativo de acción sistémica Benomil (2 g L^{-1}) (Acosta *et al.*, 2005). Otros investigadores, con el empleo del complejo carbendazim-p-ciclodextrina, en concentraciones variables, demostraron que era posible inhibir el crecimiento micelial de los contaminantes

del cultivo *in vitro* de plantas pertenecientes a los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Spicaria*, *Fusarium*, *Pestalotia* y *Colletotrichum* (Cruz *et al.*, 2002).

Para la desinfección del explante inicial, se han empleado comúnmente soluciones de hipoclorito de sodio (NaCl) en concentraciones entre 0.5 y 5 % (Martínez, 1995). Las soluciones de hipoclorito de calcio (CaCl) son tan efectivas como las de sodio (Bernejee, 1985). De forma general, se plantea que la escisión del explante es recomendable realizarla después de la desinfección, para eliminar tejidos que han sido dañados por la solución de hipoclorito. La aplicación de una doble desinfección con hipoclorito de sodio o calcio, seguido del enjuague con alcohol etílico al 70 % durante 3 – 5 minutos seguido de agua destilada y esterilizada por dos a tres minutos, ha sido empleada con éxito. Esto permite que las esporas que no puedan ser destruidas inicialmente, pasen a formas vegetativas y durante la doble desinfección sean eliminadas fácilmente de los explantes primarios, lo que conlleva a un menor porcentaje de contaminación microbiana (Novat *et al.*, 1988).

El uso de ciertos antibióticos puede eliminar grupos discretos y particulares de bacterias, pero en la mayoría de los casos se necesitan sustancias de un espectro más amplio. El empleo de agentes químicos desinfectantes como el Basamid, Brassicol, Benlate, PPM (Plant Preservative Mixture) o mezclas de ellos permite la eliminación e inhibición del crecimiento bacteriano (Marcano & Pire, 1993). Otros investigadores, en la micropropagación de especies vegetales, obtuvieron experiencias con el uso de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano (Meyer *et al.*, 1992). Estas sustancias son antibióticos como la rifampicina, cefotaxima, gentamicina, estreptomycin, ampicilina, entre otros. También se han empleado otras sustancias como Meropenem que ha mostrado una elevada actividad antimicrobiana (Hussain *et al.*, 1994). El uso de nitrato de plata en los medios de cultivo permitió controlar el crecimiento de contaminantes no patogénicos, sin afectar el crecimiento en plántulas de tomate (Kubota & Tadokoro, 1999).

También es necesaria la incorporación de agentes antioxidantes (L-cisteína, ácido ascórbico, ácido cítrico y polivinilpirrolidona) para prevenir el ennegrecimiento tisular causado por la oxidación de polifenoles presentes en los explantes. Este ennegrecimiento puede causar la muerte de los mismos (Sponsel, 1995).

Frecuentemente, el establecimiento del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, como el caso de la mayoría de las especies, se ve impedido por la aparición de oscurecimiento y necrosis de los tejidos (Yu & Meredith, 1986; Marks & Simpson, 1990; Dalal *et al.*, 1992). El fenómeno de ennegrecimiento ocurre por acción de enzimas tipo polifenoloxidasas y tirosinasas, que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren heridas. Estas actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas, sustancias que a su vez pueden polimerizarse, afectar las proteínas y, en consecuencia, inhiben el crecimiento y la viabilidad de los explantes (Read & Economou, 1987).

Los tejidos adultos, particularmente, liberan al medio de cultivo pigmentos constituidos principalmente por polifenoles y taninos, es por eso que la oxidación fenólica es un problema grave en el cultivo *in vitro* de las especies vegetales, donde se ha logrado disminuir este problema con el uso del sombreamiento (Marks & Simpson, 1990; Albornoz *et al.*, 1993; Leon *et al.*, 1997).

La síntesis de los precursores de fenoles es más activa y compleja en los tejidos maduros que en los jóvenes y está directamente influida por el contenido de sales y reguladores del crecimiento en el medio de cultivo (Muhitch & Fleycher, 1985). Se han utilizado varios métodos, con el fin de controlar la oxidación fenólica. Entre ellos cabe mencionar el pre-tratamiento de explantes con antioxidantes (Murashige, 1974; Hildebrandt & Haniey, 1988), la incorporación de antioxidantes (Hildebrandt & Haniey, 1988) o carbón activado (Claudebon, Gendraud & Franclet, 1988) al medio nutritivo, el cultivo de explantes provenientes de las zonas en estado de crecimiento activo y la realización adecuada de subcultivos frecuentes (Muhitch & Fleycher, 1985), el subcultivo frecuente en medio fresco (Broome & Zimmerman, 1978), la inmersión en agua destilada estéril algunas

horas antes de la siembra *in vitro* (Vieitez & Vieitez, 1980) y la modificación de las condiciones ambientales *in vitro* al iniciar los cultivos en oscuridad (Meyer, 1984) o a bajas temperaturas (Muhitch & Fleycher, 1985), lo cual ha disminuido el oscurecimiento de explantes. Las enzimas involucradas en la biosíntesis y oxidación de fenoles se incrementan con la luz, por lo que es conveniente mantener los explantes en la oscuridad unos días antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja (George & Slierrington, 1984).

2.2.6 Callogénesis

Es el proceso en el cual un tejido diferenciado raíz, tallo, hoja, flor, entre otros inicia con la división de células a manera de tumoraciones denominadas “callo” esto se logra mediante la adición de reguladores del crecimiento, fuentes de carbono, minerales y vitaminas al medio de cultivo en el cual se siembran los explantes de interés, así bien el callo es un tejido desorganizado formado por una masa de células vegetales tumorales debido a que éstas crecen de manera descontrolada. La mayoría de estas células están en estado diferenciado salvo algunas que revierten al estado indiferenciado, utilizando las técnicas de cultivo *in vitro*, la formación de callos puede ser incluida en muchos tejidos vegetales y órganos en los que normalmente no era costumbre observar callos aún con lesión (Street, 1979).

La más importante característica de los callos, desde el punto de vista funcional, es su crecimiento para formar raíces, tallos y embriones capaces de regenerar plantas completas. El gran problema en el uso del callo es la inestabilidad genética que da como resultado variaciones fenotípicas en las células. Los cambios fenotípicos pudieran atribuirse a una base genética o epigenéticas (Binns, 1981; citado por Dodds, 1985).

De los conceptos anteriores se deriva el término morfogénesis, que se define como el conjunto de los fenómenos relativos a la diferenciación celular y el desarrollo de los tejidos y órganos de la planta lo cual conduce a la embriogénesis somática y la organogénesis (Zapata, 1994) y es el resultado de una organizada división y diferenciación celular con patrones definidos y que dependen

básicamente de la actividad y expresión de ciertos genes (Santana, 1993). Cuando se realiza el cultivo de tejidos, el control de la morfogénesis se realiza a través de la incorporación exógena de compuestos hormonales y otros elementos nutricionales. Al ser colocado un fragmento de tejido en un medio de cultivo posibilita la liberación de las células del control a que están sometidas en el organismo vivo y se readquiere la capacidad de división celular.

2.2.7 Organogénesis

La organogénesis es un proceso que implica rediferenciación de células meristemáticas presentes en callos a brotes. Estos brotes son estructuras monopolares las cuales a su vez dan lugar a primordios de hojas y meristemos. Zhong *et al.* (1992) demostraron que los meristemos obtenidos de semillas maduras son morfológicamente flexibles y pueden ser manipulados para producir múltiples brotes y embriones somáticos en maneras relativamente independientes del genotipo por simple variación de las condiciones de cultivo *in vitro*.

O'Connor-Sánchez *et al.* (2002), modificaron el protocolo de Zhong *et al.* (1992) y encontraron que, bajo condiciones de luz primero obtuvieron callos organogénicos; subsecuentemente, en oscuridad, algunas regiones de los callos generaron estructuras parecidas a las embriogénicas; las cuales cambiándolas a la luz produjeron callo organogénico. Con esto probaron que la interconversión de callo organogénico a callo embriogénico es posible en cereales. Además de que los callos obtenidos mostraron una alta capacidad de regenerar plantas. Muoma *et al.* (2008), reportaron regeneración por organogénesis directa de dos variedades de polinización abierta, un híbrido y una línea usando brotes de ápices como explantes. El número de brotes dependió del genotipo. Krishna *et al.* (2013) obtuvieron tanto callo embriogénico como callo organogénico a partir de secciones nodales de embriones maduros.

2.2.8 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática se define como el proceso dónde los cultivos de callos, suspensión o protoplastos desarrollan embriones completos, similares a los embriones zigóticos producidos en las semillas (Green, 1983). El embrión somático es una estructura bipolar independiente y no está morfológicamente unida al tejido original. Dichos embriones posteriormente desarrollan raíces, ápice y sus órganos cotiledonares, por lo que son capaces de germinar en plántulas de la misma manera como sucede con los embriones zigóticos (Ammirato, 1983).

Cuando los embriones inmaduros son colocados en el medio de cultivo, las células del escutelo se vuelven activas, el número de organélos incrementa y la morfología vacuolar y nuclear cambia. Esta reacción es llamada respuesta de shock. Una segunda respuesta es la inducción de callo, llamada respuesta de crecimiento y depende de la presencia de reguladores de crecimiento y es caracterizada por actividad mitótica en las células que son sensitivas a estos. En el escutelo se da la aparición de una amplia zona meristemática escutelar y se observa una segunda región meristemática alrededor de la coleorriza (Bronsema *et al.*, 1997).

Las técnicas de embriogénesis somática fueron originalmente desarrolladas para satisfacer dos metas principales: la micropropagación masiva y el desarrollo de herramientas celulares para el mejoramiento genético (por ejemplo semillas sintéticas y transformación genética). Éstas técnicas se apoyan en el uso de auxinas sintéticas para inducir la des-diferenciación de los tejidos y la formación de callo embriogénico (Strosse *et al.*, 2003).

2.2.9 Diferenciación y desdiferenciación celular

La diferenciación comprende los cambios morfológicos y fisiológicos que conllevan a la especialización de las células y a la formación de los diferentes tejidos y órganos de la planta. En todas las plantas se presentan las células embrionarias indiferenciadas y es a partir de ellas que ocurre la diferenciación de

los tejidos permanentes primarios de la planta esto ocurre de forma normal durante la formación de los órganos de las plantas (Torres *et al.*, 1998).

En las raíces y tallos de las plantas dicotiledóneas y en las plantas con semillas desnudas (gimnospermas) se presenta un crecimiento secundario en mayor o menor cantidad según la actividad del cambium y del felógeno. Esos son meristemos secundarios que se van a originar a partir de la dediferenciación de las células de parénquima. Estos meristemos secundarios, al entrar en actividad producirán por rediferenciación los tejidos permanentes secundarios y las plantas crecen en grosor.

En condiciones *in vitro*, mediante ese mecanismo se puede obtener el cultivo de tejido, de cualquier planta y de cualquier órgano de la planta, la única condición es que se parta de células vivas. O sea, se puede obtener el cultivo de meristemos y la diferenciación de brotes y raíces, siempre que se parta de un pedazo de la planta (explante) que tenga células vivas. Este es el fundamento fisiológico de la obtención de los cultivos de tejidos vegetales *in vitro*, tanto de plantas dicotiledóneas (tabaco, papa, tomate, entre otras.) como de plantas monocotiledóneas (arroz, maíz, caña de azúcar, entre otras.) esto se logró por primera vez a partir de la década de los años 30 del siglo pasado y es una metodología básica imprescindible que se aplica en la Biotecnología Vegetal actual para regenerar las plantas (Roca & Mroginski, 1991).

Para lograr este mecanismo juegan un papel primordial las fitohormonas que se deben añadir a los medios de cultivo; según los requerimientos de los diferentes medios y los objetivos que se persigan. Las fitohormonas más utilizadas son las auxinas (AIA, ANA, 2,4-D) y las citocininas (KIN, BAP, Zeatina) generalmente en concentraciones que oscilan entre 0.1 – 10.0 mg L⁻¹ (Sponsel, 1995).

2.2.10 Callogénesis en cereales

El progreso en la investigación con cereales referentes al uso del cultivo de tejidos como herramienta para la regeneración de plantas, ha sido limitado. En maíz (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) y otros cereales (Vasil &

Vasil, 1991; Rosati *et al.*, 1994; Boget *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 1996; Seetharama *et al.*, 2000), ha sido difícil obtener plántulas regeneradas mediante cultivo de callo embriogénico o por inducción de organogénesis.

La embriogénesis somática en cereales requiere nueve o más meses desde la obtención del explante hasta el crecimiento de las plantas regeneradas en suelo (Sairam *et al.*, 1999; Seetharama *et al.*, 2000); mediante organogénesis este periodo se puede reducir considerablemente con el empleo de ápices de brotes como explantes (Nahdi & de Wet, 1995). La organogénesis directa en especies como maíz, permitiría evadir los problemas hormonales que se presentan al tratar de regenerar plántulas vía cultivo de células, callos y embriones somáticos, pero la organogénesis directa a partir de ápices ha producido escasos brotes en maíz (Raman *et al.*, 1980). Por tanto, se requiere una metodología que proporcione en poco tiempo una alta producción de brotes provenientes de yemas adventicias y axilares. También se requiere contar con genotipos aptos para su multiplicación *in vitro*.

En el cultivo *in vitro* de cereales importantes como el trigo (*Triticum aestivum* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.) y arroz (*Oryza sativa* L.), se han usado ampliamente los embriones zigóticos maduros e inmaduros para desarrollar líneas de callos, suspensiones celulares y protoplastos. Sin embargo, la incompetencia de estos explantes en algunas variedades élites ha sido una barrera que dificulta el cultivo *in vitro* y su regeneración, debido a la dependencia del genotipo y a la trabajosa manipulación de algunos de ellos, como los embriones inmaduros. Durante la pasada década, se manejaron exitosamente *in vitro* los meristemos apicales de plantas obtenidas en semilleros de maíz (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.), trigo (*Triticum aestivum* L.) y cebada (*Hordeum vulgare*), para desarrollar procedimientos de regeneración rápidos e independientes del genotipo (Sticklen & Oraby, 2005). A partir de estos puede ocurrir una organogénesis indirecta que incluya primeramente una fase de callos y a continuación la formación de brotes en un medio con una baja relación auxina / citoquinina (Tabares *et al.*, 2004).

La variabilidad genotípica de los materiales biológicos se puede aprovechar para la inducción de organogénesis *in vitro*, ya que las características morfológicas, organogénicas y nutricionales de las especies están determinadas por el genotipo. Es posible entonces hacer más eficiente la investigación *in vitro* de cereales (Casas *et al.*, 1993), si se usan los genotipos más organogénicos.

También conviene mejorar la metodología de regeneración vía organogénesis, por ejemplo mediante la selección de la mejor consistencia física del medio de cultivo, ya que ésta influye en la aireación y disponibilidad de nutrimentos en el explante; además, hay que escoger la mejor combinación hormonal para maximizar la organogénesis de cada genotipo.

Armstrong y Green (1984) y Armstrong y Phillips (1988) propusieron que al menos dos tipos diferentes de callo en el cultivo de tejidos pueden ser iniciados al cultivar *in vitro* cereales a partir de embriones maduros.

Callo Tipo-I (organogénico/embriogénico) es caracterizado por un alto grado de asociación celular y diferenciación, es decir callo compacto y organizado. Aunque embriones somáticos bien desarrollados son ocasionalmente observados en callos Tipo-I, el modo de origen de regenerar brotes no es obvio, ya que observaciones histológicas a este tipo de cultivo generaron evidencia que la regeneración de plantas puede ocurrir tanto por organogénesis como por embriogénesis somática Armstrong y Green (1984) y Armstrong y Phillips (1988). Hasta la fecha en la mayoría de los protocolos de transformación las plantas regeneradas son obtenidas de éste tipo de callo.

Callo Tipo-II (friable/embriogénico) es disgregable e indiferenciado, excepto por la presencia de numerosos embriones somáticos en estado globular. Observaciones histológicas de callos de maíz Tipo-II han mostrado que la regeneración de plantas ocurre por medio de embriogénesis somática (Armstrong & Green, 1984; Armstrong & Phillips, 1988).

La regeneración de plantas de callo embriogénico Tipo- II derivado de embriones maduros ha sido el sistema más utilizado y reproducible de regeneración y/o transformación para cereales (O'Connor-Sánchez *et al.*, 2002).

2.2.11 Explante

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada.

Si el objetivo final es la producción de callos, es factible la utilización de una vasta gama de explantes que, cultivados en condiciones apropiadas, permiten la proliferación callosa. Cualquier explante que contenga células nucleadas vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos; por ejemplo, en el caso de numerosas dicotiledóneas herbáceas se puede lograr la proliferación callosa con relativa facilidad mediante la utilización de explantes provenientes de diversas partes del vegetal. 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. Esta facilidad para la proliferación callosa puede hacerse extensiva a células y protoplastos, con el empleo de técnicas y medios de cultivo más elaborados.

El éxito del cultivo de tejidos es altamente dependiente del tejido donador elegido para la iniciación del cultivo, así como del genotipo de las plantas y también de los estados fisiológicos y de desarrollo apropiados, ya que de estos y de las condiciones de cultivo dependerá la regeneración, por lo general a través de embriogénesis somática (Green, 1983).

Los explantes que contienen células meristemáticas inmaduras, desarrollan callos que son competentes para expresar totipotencia. Los meristemas de brotes, bases de hojas jóvenes, inflorescencias inmaduras, embriones inmaduros, tejido nodal, anteras, embriones maduros y en raras ocasiones puntas de raíz producen callo regenerable en diferentes especies de cereales. Pero los embriones maduros son los más ampliamente usados (Bhaskaran &

Smith, 1990). En general, para todas las especies de cereales el tejido escutelar de embriones maduros es un explante adecuado, del cual, pueden ser regeneradas plantas fértiles en altas frecuencias vía embriogénesis somática (Brettschneider, *et al.*, 1997). La característica primordial de los embriones maduros es que tengan el tamaño adecuado de 1.0 a 2.0 mm, lo cual se logra a diferentes días después de la polinización dependiendo tanto del genotipo como de las condiciones ambientales.

Debido a los problemas metodológicos y logísticos que implica el uso de embriones inmaduros (tiempo de recolección, tamaño apropiado, polinizaciones artificiales, espacios de crecimiento adecuados) se optó por el uso de semillas maduras para producir los explantes que forman el callo. Wang (1987) utilizó por primera vez embriones maduros, logrando la regeneración. Posteriormente O'Connor-Sánchez *et al.* (2002) y Sairam *et al.* (2003) utilizaron ápices de los cuales se logró formar callo que pudo ser transformado y regenerado. Por otra parte, Huang y Wei (2004) utilizaron plúmulas y más recientemente Al-Abed *et al.* (2006) y Abebe *et al.* (2008) se basaron en la técnica *split seed* en semillas maduras, con la cual quedan expuestas tres distintas regiones capaces de regenerar: el escutelo, el anillo coleopitar y el meristemo apical. Sidorov *et al.* (2006) utilizó secciones nodales de plántulas, con lo cual generó callo tipo I que a su vez podía ser convertido a callo tipo II. Jia *et al.* (2008), utilizaron embriones completos y obtuvieron callo embriogénico y Krishna *et al.* (2013) quienes, al utilizar secciones nodales pudieron inducir callo embriogénico y callo organogénico. Determinaron que hay tres vías distintas de diferenciación: formación de callo, embriogénesis somática u organogénesis directa; dependiendo de la composición del medio y de la región específica del embrión.

El callo embriogénico puede ser identificado fácilmente por sus características morfológicas y citológicas: éste es de apariencia compacta, superficie nodular, de color blanco amarillo pálido y con cierto aspecto organizado. El mismo se encuentra rodeado frecuentemente por un callo no embriogénico de apariencia suave, friable y semitraslúcido. En muchos casos se observan porciones de

callos embriogénicos distribuidos al azar en la superficie del callo no embriogénico. El callo embriogénico crece de forma más lenta que el callo no embriogénico, pero puede ser mantenido en cultivo por largos períodos de tiempo mediante la selección cuidadosa y el subcultivo de los sectores embriogénicos (Vasil & Vasil, 1984).

2.2.12 Efecto de la luz y la temperatura en la callogénesis

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, 1993).

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 & 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) reportaron 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.

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 & Ross, 1994).

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 plastídios y tilacoides sufre cambios ultraestructurales y aumenta la densidad del citoplasma (Huják & 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 & Jonak, 2012; 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 & Jiménez, 2010).

3 ARTÍCULO

CULTIVO *IN VITRO* Y CALLOGÉNESIS A PARTIR DE EXPLANTES DE AMARANTO (*Amaranthus spp*)

IN VITRO CULTURE AND CALLOGENESIS FROM AMARANTH EXPLANTS (*Amaranthus spp*)

José Juan Ríos Padilla¹, José Luis Rodríguez de la O¹, Agustín de Jesús López Herrera¹, José Sergio Barrales Domínguez¹

RESUMEN

El amaranto es un cultivo marginal en México con apenas 2000 ha, que por su alta calidad de proteína así como aminoácidos esenciales, deficientes en otros granos tiene perspectivas de desarrollo tanto en México como en el mundo, además tiene otros usos como arvense, forraje, esquilmo u ornamental. El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una técnica comúnmente utilizada que se basa en organogénesis a través de callos embriogénicos somáticos los cuales pueden ser obtenidos a partir de diferentes tipos de explantes. Sin embargo, se ha observado que la obtención de callos embriogénicos con posibilidad de regeneración en plantas funcionales son respuestas dependientes del tipo y concentración de regulador de crecimiento empleado así como de la fuente de carbono. El objetivo del presente trabajo fue identificar las condiciones de cultivo *in vitro* necesarias para obtener callo embriogénico a partir de mesófilo de hoja, tallo, yema axilar y embriones maduros de tres variedades de amaranto pertenecientes a las especies *Amaranthus hypochondriacus* L de las cuales no se encontró reportes de haberse utilizado en cultivo de tejidos. Utilizando el medio de cultivo de inducción de callo suplementado con 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D para explantes de mesófilo de hoja, se obtuvieron callos embriogénicos con una frecuencia de inducción de 90 % en comparación con la frecuencia de inducción usando como explantes embriones maduros que fue de 96 % en el medio suplementado con 20 mg L⁻¹ de maltosa y 5 mg L⁻¹ de glucosa estos resultados se refieren a los mejores tratamientos cuyos callos presentaron un color cremoso traslucido y/o verde clorofílico además de una consistencia friable y semicompacta ($P \leq 0.05$) características que se consideran óptimas para la obtención de callos embriogénicos con posibilidad de regeneración en plantas completas o funcionales.

PALABRAS CLAVE: *Amaranthus hypochondriacus* L, Embrión maduro, Mesófilo de hoja, Callo embriogénico.

ABSTRACT

Amaranth is a marginal crop in Mexico with only 2000 ha, which because of its high quality of protein as well as essential amino acids, deficient in other grains has prospects for development both in Mexico and in the world, in addition to other uses such as arvense, fodder or ornamental crop. *In vitro* culture of plant tissues is a commonly used technique that is based on organogenesis through somatic embryogenic calli which can be obtained from different types of explants. However, it has been observed that the production of embryogenic callus with possibility of regeneration in functional plants is a response dependent on the type and concentration of growth regulator used as well as the carbon source. The objective of this study was to identify the *in vitro* culture conditions necessary to obtain embryogenic callus from leaf mesophyll, stem, axillary bud and mature embryos of three varieties of amaranth belonging to the species *Amaranthus hypochondriacus* L of which there were no reports of their prior use tissue culture. Using the callus induction culture medium supplemented with 3.0 mg L⁻¹ 2,4-D for leaf mesophyll explants, embryogenic calli were obtained with an induction frequency of 90 % compared to the induction frequency using explants mature embryos which was 96 % in the medium supplemented with 20 mg L⁻¹ maltose and 5 mg L⁻¹ glucose these results refer to the best treatments whose calli presented a translucent creamy color and/or chlorophyll green in addition to a friable and semicompact consistency ($P \leq 0.05$) characteristics that are considered optimal for the production of embryogenic calli with possibility of regeneration in complete or functional plants.

KEYWORDS: *Amaranthus hypochondriacus* L, Mature embryo, Leaf mesophyll, Embryogenic callus.

¹Programa de Maestría en Ciencias en Horticultura. Instituto de Horticultura y Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Edo. de México. CP 56230.

4 INTRODUCCIÓN

La producción de callo requiere de un explante inicial, el que puede tener una alta diferenciación de sus tejidos, como un trozo de raíz, tallo u hoja, o bien la utilización de tejidos menos diferenciados como hipocótilos y cotiledones de plántulas recién germinadas e incluso embriones zigóticos maduros e inmaduros (Correia & Canhoto 2010). También, aunque con menor frecuencia, se han utilizado tejidos florales como estambres, pétalos y ovarios (Stefanello *et al.*, 2005). En cualquier caso, la inducción de callo representa un proceso de dediferenciación y división celular intensiva, el cual depende principalmente del explante, genotipo, medio de cultivo, tipo de regulador de crecimiento como también su concentración y combinación (Larson *et al.*, 2006; Feeney *et al.*, 2007; Rashmi & Trivedi 2014).

La organogénesis indirecta a menudo induce la variabilidad genética y permite exponer características diferentes que no están expresadas normalmente en la naturaleza o bien eliminar alguna indeseable (Sala & Labra 2003). La más importante característica de los callos, desde el punto de vista funcional, es su crecimiento para formar raíces, tallos y embriones capaces de regenerar plantas completas. El gran problema en el uso del callo es la inestabilidad genética que da como resultado variaciones genotípicas en las células. Los cambios fenotípicos pudieran atribuirse a una base genética o epigenética (Binns, 1981; citado por Dodds, 1985).

Después del crecimiento del callo, se hace necesario subcultivarlo en un medio de cultivo fresco ya que el crecimiento en el mismo medio puede ocasionar que se agoten algunos elementos nutritivos. El callo embriogénico puede ser identificado fácilmente por sus características morfológicas y citológicas: éste es de apariencia compacta, superficie nodular, de color blanco amarillo pálido y con cierto aspecto organizado (Vasil & Vasil, 1984). El mismo se encuentra rodeado frecuentemente por un callo no embriogénico de apariencia suave, friable y semitraslúcido. En muchos casos se observan porciones de callos embriogénicos distribuidos al azar en la superficie del callo no embriogénico.

El callo embriogénico crece de forma más lenta que el callo no embriogénico, pero puede ser mantenido en cultivo por largos períodos mediante la selección cuidadosa y el subcultivo de los sectores embriogénicos.

El cultivo de células, tejidos y órganos vegetales *in vitro* está generalmente asociado a varios problemas de calidad fisiológica, epigenética y genética, como la recalcitrancia, la hiperhidricidad y la variabilidad genética (Cassells & Curry, 2001). Aunque esta última puede ser indeseable en algunos casos, como cuando se requiere mantener la identidad clonal del material propagado, también tiene implicaciones importantes para los programas y estrategias de fitomejoramiento (Karp, 1995; Jain, 2001).

Existen varios factores que inciden en la obtención de callos que presentan variabilidad genética (Karp, 1995). Como regla general, entre mayor sea el nivel de desorganización del tejido del explante y mayor el tiempo que éste pasa en la fase de cultivo *in vitro*, mayores serán las probabilidades de generarla. Esta variación se ve influenciada por la constitución genotípica y los niveles de ploidía del explante, por lo que si se considera un mismo grado de ploidía, algunos genomas pueden ser más estables que otros. El tipo y la concentración de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo influyen también en la generación de variabilidad genética ya que éstos pueden actuar como mutágenos (especialmente los sintéticos), o influir sobre la división celular, el grado de crecimiento desorganizado y la proliferación selectiva de tipos celulares específicos.

Por último, generalmente se observa que, entre más viejo y más especializado es el explante, mayor es la posibilidad de recuperar callos bien estructurados. Jelenic *et al.* (2001) plantearon la importancia de las condiciones ambientales durante el cultivo y la presencia o ausencia de agentes selectivos *in vitro*, como generadores de variabilidad.

En un contexto general, los cambios incluyen aneuploidias y euploidias de las células cultivadas (Lee & Phillips, 1988; Jain, 2001). Los cambios más frecuentes en la mayoría de las especies son los de tipo estructural, y dentro de estos, los

que involucran modificaciones de ciertas características fenotípicas (Lee & Phillips, 1988).

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar el comportamiento de las líneas de amaranto 'Arely', 'Diego' y 'PQ2' bajo condiciones de cultivo *in vitro* evaluando físicamente los callos obtenidos respecto a las características del medio de cultivo en el cual fueron sembrados.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron las líneas de amaranto 'Arely', 'Diego' y 'PQ2' las cuales tienen excelente adaptabilidad a climas fríos, colores vivos, buen tamaño de panoja, rendimiento en grano y follaje abundante. Estas líneas comúnmente se cultivan en los valles centrales y sierra sur del estado de Oaxaca produciéndose en mayor extensión en el estado de Tlaxcala.

El material fue obtenido por semillas las cuales fueron depositadas en una charola de germinación de 240 cavidades, colocando cuatro semillas por cavidad, el sustrato utilizado fue peatmoss y las plantas fueron regadas cada tercer día a partir del momento de la siembra.



Figura 1 Plántulas de amaranto 10 días después de la siembra.

A los 15 días después de la siembra, las plántulas habían alcanzado una altura que oscilaba de 10 a 12 cm, característica que las hizo aptas para la obtención de explantes y siembra *in vitro*.

5.1 Manejo de los explantes utilizados

Se llevó a cabo con material vegetal desinfestado, actividad que se realizó bajo el siguiente protocolo:

- 1) Envolver el material vegetal en una gasa quirúrgica con la finalidad de evitar daños mecánicos en las hojas.

- 2) Lavar vigorosamente con jabón y tween 80 o 20 según la disponibilidad, enjuagar.
- 3) Sumergir en alcohol al 70 % durante un lapso de entre 1 – 3 minutos, enjuagar.
- 4) Pasar a hipoclorito de sodio al 10 % durante 15 minutos, enjuagar.
- 5) Enjuagar tres veces con agua esterilizada.

En el tercer enjuague dejar los explantes dentro del agua y llevar a la campana de flujo laminar.

La desinfección de las semillas se realizó bajo el siguiente protocolo:

- 1) Colocar semillas de amaranto en un matraz Erlen Meyer.
- 2) Lavar vigorosamente con jabón y tween 80 o 20, según la disponibilidad, utilizando un agitador mecánico durante 20 minutos, enjuagar con agua destilada tantas veces como sea necesario hasta eliminar por completo los residuos de jabón.
- 3) Sumergir las semillas en alcohol al 70 % durante un lapso de entre 1 - 3 minutos, utilizando nuevamente el agitador mecánico, enjuagar.
- 4) Pasar a hipoclorito de sodio al 15 % durante 15 minutos, dar tres enjuagues con agua destilada.
- 5) Por ultimo enjuagar tres veces con agua esterilizada, en el tercer enjuague dejar las semillas en un proceso de imbibición, por un lapso de 24 horas aproximadamente, para promover una adecuada hidratación de las mismas y así facilitar la extracción del embrión, la cual, debido al tamaño de la semilla se realizó con ayuda de un microscopio estereoscópico.

5.2 Inducción de callo en material vegetal

Se indujo la formación de callo utilizando como explantes mesófilo de hojas, trozos de tallo y yemas axilares de plántulas de amaranto (*Amaranthus spp*).

El medio de cultivo constó de las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) al 100 %, suplementadas con 0.40 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 3 % de sacarosa, 7 gr L⁻¹ de agar, adicionando ácido cítrico y ácido ascórbico a

concentraciones de 150 y 100 mg L⁻¹, respectivamente, como antioxidantes y un pH de 5.7.

El diseño experimental fue completamente al azar, las concentraciones y reguladores de crecimiento se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1 Concentraciones y reguladores del crecimiento utilizados en la inducción de callo.

Tratamiento	Concentracion mg L ⁻¹	
	2, 4-D	TDZ
T1	0.0	0.0
T2	1.0	1.0
T3	3.0	3.0
T4	10.0	10.0

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; TDZ: Tidiazurón.

La siembra se realizó en cajas Petri, designando cinco cajas por tratamiento en las cuales se colocaron tres explantes tomando cada uno como una repetición, es decir, para cada concentración había 15 repeticiones de cada uno de los tipos de explante (mesofilo de hoja, tallo y yema axilar) lo que dió un total de 45 repeticiones por concentración y 180 repeticiones por regulador.

Una vez sembradas las cajas fueron colocadas en obscuridad dentro de una incubadora a temperatura estable de 27 °C, las variables evaluadas fueron porcentaje de formación de callo, incremento de masa, color y textura, la toma de datos se realizó cada semana cabe mencionar que los explantes permanecieron en medio de inducción de callo durante ocho semanas.

El medio de cultivo para regeneración o rescate de callos formados tenía las mismas características que el anterior, la diferencia radicó en la concentración y regulador del crecimiento empleado, lo anterior se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2 Concentraciones y reguladores del crecimiento utilizados en la inducción de callo.

Tratamiento	TDZ mg L ⁻¹
T1	3.0
T2	5.0
T3	10.0

TDZ: Tidiazurón

La siembra se realizó en frascos, se designaron cinco frascos por tratamiento y tipo de explante colocando tres callos por frasco tomando cada uno como una repetición, considerando los tres tipos de explante utilizados el total de repeticiones fue de 135.

Una vez sembrados los frascos fueron colocados en luz dispuestos en estantes a temperatura ambiente, el diseño experimental fue completamente al azar, las variables evaluadas fueron porcentaje de callos embriogénicos, incremento de masa, color y textura, la toma de datos se realizó cada semana cabe mencionar que los explantes permanecieron en medio de regeneración durante 3 semanas.

5.3 Ensayo de inducción de callo en embriones maduros

El medio de cultivo constó de las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) al 100 %, suplementadas con 0.40 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 3 % de sacarosa, 3 mg L⁻¹ 2,4-D, 7 gr L⁻¹ de agar, adicionando ácido cítrico y ácido ascórbico a concentraciones de 150 y 100 mg L⁻¹, respectivamente, como antioxidantes y un pH de 5.7.

Se colocaron 150 embriones en frascos, diferenciados en tres bloques por variedad sembrada ('Arely', 'Diego' y 'PQ2') cada batería con 50 embriones, el arreglo experimental fue completamente al azar, considerando cada embrión como una repetición, colocándose en una incubadora a una temperatura de 27 °C.

Se evaluó de manera meramente visual el porcentaje de formación de callo, dos semanas después de la siembra *in vitro*, para determinar qué línea sería la utilizada para los experimentos siguientes.

5.4 Inducción de callo en embriones maduros

El medio de cultivo constó de las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) al 100 %, suplementadas con 0.40 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 3 % de sacarosa, 3 mg L⁻¹ 2,4-D, 7 gr L⁻¹ de agar, adicionando ácido cítrico y ácido ascórbico a concentraciones de 150 y 100 mg L⁻¹, respectivamente, como antioxidantes y un pH de 5.7.

Se colocaron 600 embriones de la línea de amaranto 'PQ2' en frascos Gerber, diferenciados en tres bloques por fechas de siembra con 200 embriones por batería, el arreglo experimental fue completamente al azar, considerando cada embrión como una repetición, colocándose en una incubadora a una temperatura de 27 °C.

5.4.1 Medio de regeneración

Constó de las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) al 100 %, suplementadas con 0.40 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 3 % de sacarosa, 7 gr L⁻¹ de agar, adicionando ácido cítrico y ácido ascórbico a concentraciones de 150 y 100 mg L⁻¹, respectivamente, como antioxidantes y un pH de 5.7. Además de que se incluyen los tratamientos que se presentan a continuación.

Cuadro 3 Tratamientos, concentraciones y reguladores empleados.

Tratamientos mg L ⁻¹		
BA (1)	KIN (2)	2iP (3)
0.1	0.1	0.1
1.0	1.0	1.0
3.0	3.0	3.0

BA: Bencil-adenina, KIN: Kinetina, 2iP: 2-Isopentil-adenina.

Con lo anterior se evaluó la concentración óptima, mínima y máxima letal de regulador para la regeneración de plantas funcionales, utilizando los callos obtenidos del experimento anterior.

Las variables evaluadas para ambos medios fueron, incremento de masa, textura y color, la toma de datos se realizó cada semana para reducir el error experimental, cabe mencionar que en cada toma de datos del medio de formación de callo se realizó el subcultivo de estos para obtener la máxima expresión callogénica antes de colocarlos en medio de regeneración o rescate de callos.

5.5 Callogénesis en embriones maduros de Amaranto

5.5.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para la siembra de embriones *in vitro* son una variación de los reportados por Cheng *et al.* (1997) y Hu *et al.* (2003), y las concentraciones de reguladores de crecimiento utilizadas por Haliloglu y Baenziger (2005). Los embriones maduros fueron extraídos de las semillas de amaranto de la variedad 'PQ2' en condiciones asépticas con ayuda de un microscopio para posteriormente ser colocados en frascos con medio de cultivo cuyas características se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4 Composición de los medios de cultivo.

Reactivo*	Medio		
	Inducción de callo	Desdiferenciación	Regeneración
Sales MS (g/L)	4.9	4.9	3
Maltosa (g/L)	40	40	40
Glucosa (g/L)	10	---	---
Hidrolizado de caseína (mg/L)	---	100	100
MES (g/L)	1.95	1.95	1.95
MgCl ₂ (g/L)	0.75	---	---

2,4-D (mg/L)	0.5	0.2	---
Picloram (mg/L)	2.4	2.4	---
PPM (ul/L)	750	750	750
Ácido ascórbico (mg/L)	100	100	100
Ácido cítrico (mg/L)	150	150	150
Agar (g/L)	7	7	7
pH	5.8	5.8	5.6

*Todos los reactivos son de la marca registrada Sigma.

La Inducción de callo se ve beneficiada cuando el medio de cultivo contiene la fuente de carbono adecuada para que se lleve a cabo dicha inducción, dentro de las más comunes se encuentran Sacarosa, Maltosa, Glucosa e Hidrolizado de caseína. Además para propiciar la aparición de variabilidad genética estas se combinan con 2,4-D y Picloram (Taiz y Zeiger, 2002).

Tomando en consideración lo anterior se colocaron 300 embriones de la línea de Amaranto 'PQ2' en frascos estableciendo tres tratamientos, 100 embriones por cada uno, mismos que se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5 Tratamientos, concentraciones de Maltosa y Glucosa.

Reactivo	Concentración g L ⁻¹		
	T1	T2	T3
Maltosa	40	30	20
Glucosa	10	7.5	5

El arreglo experimental fue completamente al azar, colocando los frascos en una incubadora la cual tenía una temperatura de 27 °C. Las variables evaluadas fueron, incremento de masa, textura y color, la toma de datos se realizó cada semana, cabe mencionar que los callos permanecieron cuatro semanas en medio de inducción, dos semanas en medio de desdiferenciación y tres semanas en medio de regeneración.

Con la finalidad de estandarizar la toma de datos se establecieron escalas de textura y color, mismas que se diseñaron exclusivamente para esta investigación, las cuales se muestran en los cuadros 6 y 7 y figura 4 y 5, respectivamente.

Cuadro 6 Clases texturales definidas para la toma de datos característicos en callos.

Escala de textura	
Código	Característica
1	Suave acuoso
2	Friable
3	Envuelto en mucilago
4	Semicompacto
5	Compacto Duro

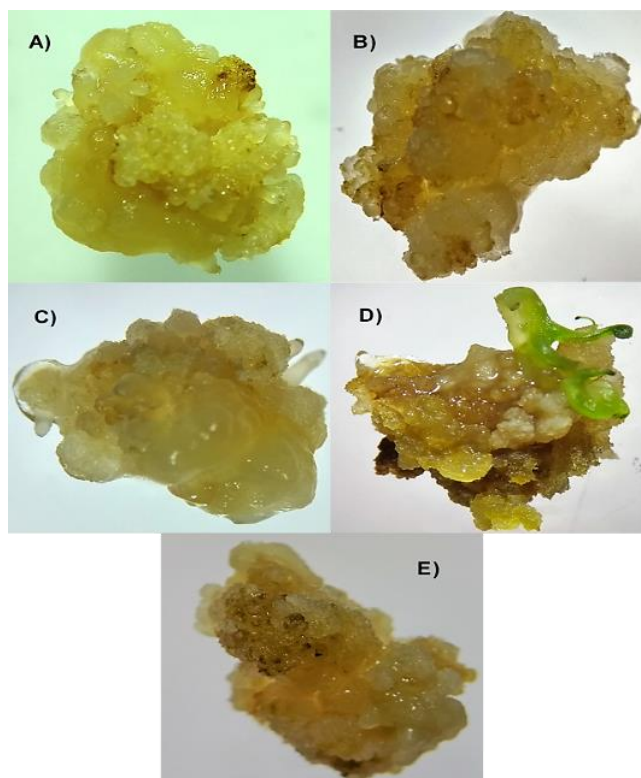


Figura 2 Clases texturales para caracterizar los callos obtenidos a partir de embriones maduros de semillas de Amaranto. A) Suave acuoso, B) Friable, C) Envuelto en mucilago, D) Semicompacto, con pigmento clorofílico, E) Compacto duro.

Cuadro 7 Escala de colores definida para la toma de datos característicos en callos.

Escala de color	
Código	Característica
1	Amarillo
2	Cremoso traslucido
3	Amarillo Cafesoso
4	Verde clorofílico

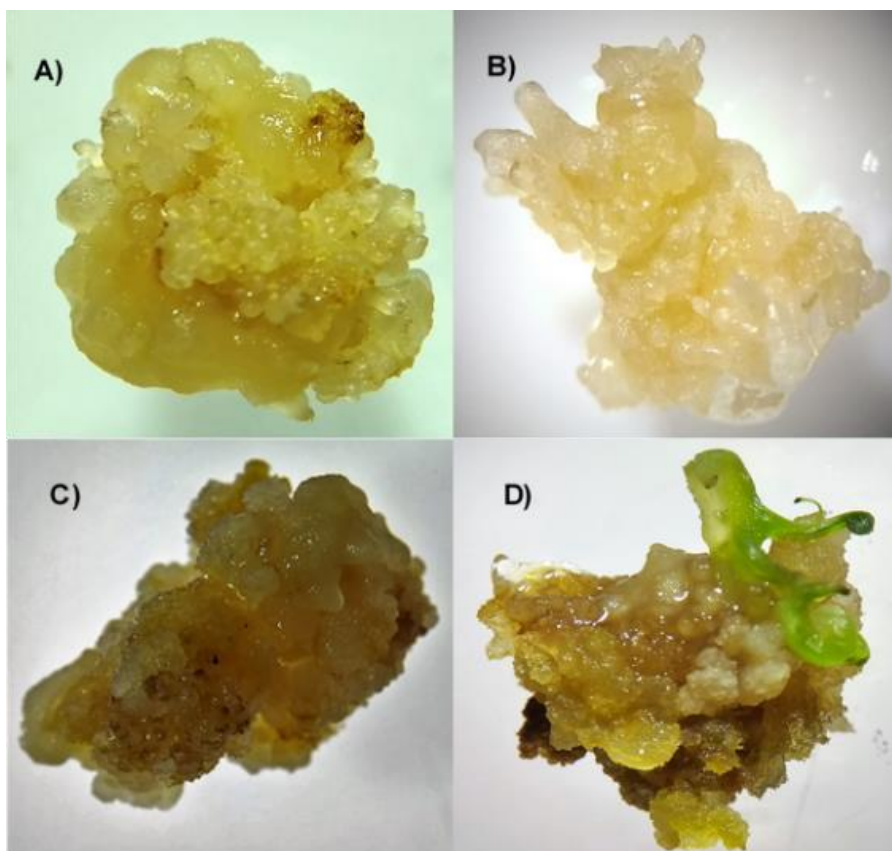


Figura 3 Escala de colores definida para caracterizar los callos obtenidos a partir de embriones maduros de semillas de Amaranto. A) Amarillo, B) Cremoso traslucido, C) Amarillo cafésoso, D) Verde clorofílico.

El análisis de los datos obtenidos en todos los experimentos anteriores se realizó por medio de una comparación de medias de Tukey con ayuda del software estadístico Minitab para los datos cuantitativos, los datos cualitativos se analizaron mediante un análisis de frecuencia numérico basado en medidas de tendencia central.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Inducción de callo en material vegetal

Todos los tratamientos presentaron formación de callo a partir de explantes de mesófilo de hoja, tallo y yema axilar de plántulas de amaranto; no obstante el 2,4-D permitió mayor porcentaje de formación de callo (91 %) a una concentración de 3.0 mg L⁻¹, así como una disminución del porcentaje de formación (47 %) en las concentraciones de 10.0 mg L⁻¹ y 0.0 mg L⁻¹. Para el caso del TDZ, los explantes utilizados se comportaron de manera similar que con la utilización de 2,4-D, donde la diferencia radicó básicamente en el porcentaje de formación de callo que fue de 83 % a una concentración de 3.0 mg L⁻¹, disminuyendo (35 %) a concentraciones de 10.0 mg L⁻¹ y 0.0 mg L⁻¹ cabe mencionar que los datos de porcentaje de formación se tomaron tres semanas después de la siembra de los explantes *in vitro* (Figura 1).

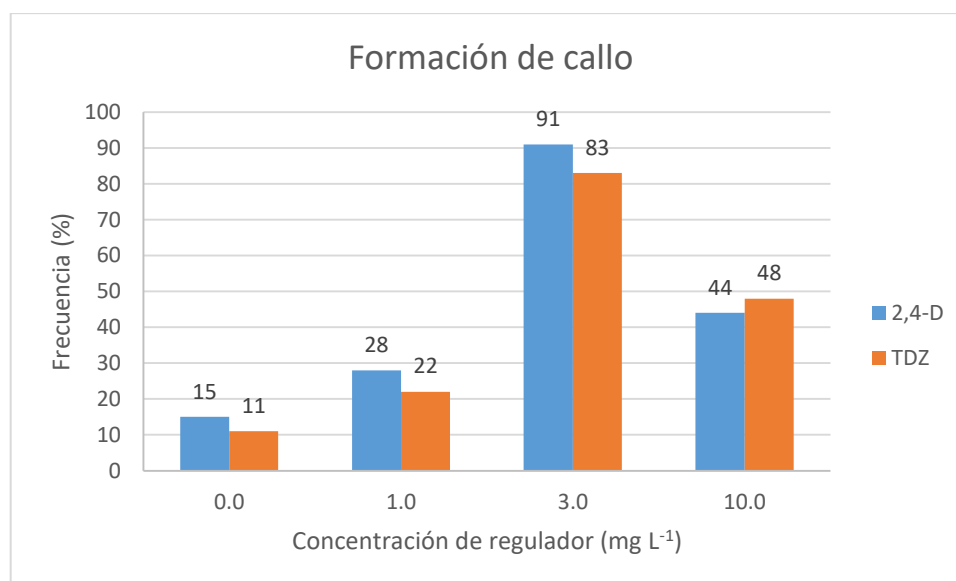


Figura 4 Frecuencia de formación de callo utilizando dos reguladores del crecimiento a cuatro niveles cada uno.

Con la finalidad de verificar si los factores estudiados influyen en el peso de callo, los resultados del análisis de varianza muestran que al menos uno de los niveles de los factores (TRAT, VAR, EXP, CONC) tiene efecto significativo ($p \leq 0.01$), mientras que las interacciones no tienen efecto en la variable respuesta. El

coeficiente de variación es alto situación debida probablemente al estrés generado por las concentraciones de los reguladores de crecimiento empleados, así como por la heterogeneidad del tamaño y tipo de los explantes utilizados.

Cuadro 8 Cuadrados medios del análisis de varianza del efecto de variedades, reguladores del crecimiento y tipo de explantes sobre el peso de callo en amaranto.

FV	GL	CM
TRAT	1	66.268**
VAR	2	2.6957**
EXP	2	7.9758**
CONC	3	37.266**
TRAT(VAR)	2	0.038 ^{NS}
TRAT(EXP)	2	0.079 ^{NS}
TRAT(CONC)	3	4.901 ^{NS}
VAR(EXP)	4	0.044 ^{NS}
VAR(CONC)	6	0.018 ^{NS}
EXP(CONC)	6	0.026 ^{NS}
TRAT(VAR)(EXP)	4	0.006 ^{NS}
TRAT(VAR)(CONC)	6	0.030 ^{NS}
TRAT(EXP)(CONC)	6	0.003 ^{NS}
VAR(EXP)(CONC)	12	0.005 ^{NS}
TRAT(VAR)(EXP)(CONC)	12	0.011 ^{NS}
ERROR	1008	0.0128
TOTAL	1079	
CV (%)		52.57

FV=Fuentes de variación; GL=Grados de libertad; CM=Cuadrados medios; CV=Coeficiente de variación; ** Significativo con un $\alpha \leq 0.05$; ^{NS} No significativo.

Tomando en cuenta que al menos un nivel de los factores estudiados tiene efecto sobre la variable respuesta, se procedió a llevar a cabo una prueba de comparación de medias (Cuadro 9), así el 2,4-D mostró una mayor ganancia de peso respecto al TDZ en un 44 % situación similar a lo reportado por Cleland (1995), quien estudió en efecto de varios reguladores del crecimiento para formación de callo en especies vegetales siendo el 2.4-D el mejor del grupo analizado. Al respecto, los reguladores del crecimiento vegetal al ser moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, eficaces a bajas concentraciones internas, cada uno de ellos no sólo influye en las respuestas de muchas partes del vegetal, sino que tales respuestas dependen de la especie, del órgano del vegetal, del estado de desarrollo, de las

concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones entre reguladores de crecimiento y de diversos factores ambientales (Salisbury & Ross, 1994).

Cuadro 9 Comparación de medias del efecto de regulador del crecimiento, variedades, explantes y concentración de regulador en el peso de callo.

Reg.	Peso de callo (g)	Var.	Peso de callo (g)	Exp.	Peso de callo (g)	Conc. (mg L ⁻¹)	Peso de callo (g)
2,4-D	1.1207a	Arely	0.9690a ^t	Hoja	1.0403a	3.0	1.2641a
TDZ	0.6253b	Diego	0.8489b	Tallo	0.8234b	1.0	0.9967b
		PQ2	0.8010b	Yema	0.7552b	10.0	0.8535c
						0.0	0.3776d
DMSH	0.0186		0.0186		0.0186		0.0186

^t Medias con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$); DMSH=Diferencia mínima significativa honesta; Reg=Regulador del crecimiento; Var=Variedad; Exp=Explante; Conc=Concentración de regulador del crecimiento.

El efecto de las variedades sobre la formación y ganancia de peso en callo fue significativa ($p \leq 0.05$) de modo que la variedad Arely superó a Diego y PQ2 en 12.4 y 17.3 %, respectivamente, podría suponerse que lo anterior podría deberse a que la variedad Arely es más precoz que Diego y PQ2, sin embargo, todas son de ciclo largo el cual va de 80 a 85 días a floración y de 150 a 170 días a madurez fisiológica, datos que cambian debido a que se producen en temporal y dependen de las condiciones edafoclimáticas por ende se elimina esa hipótesis, lo que lleva a establecer que es una condición genética la que genera las diferencias, ya que todas las especies vegetales presentan mecanismos particulares a condiciones ambientales adversas, las cuales están reguladas en mayor o menor grado por el genotipo de las mismas (Salisbury & Ross, 1994), situación que lleva a suponer que la variedad Arely presenta una mejor adaptación al estrés que genera la composición de los medios de crecimiento y desarrollo de callo *in vitro*.

Por otra parte, la comparación de medias (Cuadro 9) también muestra que al utilizar como explante segmentos de hoja se obtiene una mayor ganancia de peso de callo ($p \leq 0.05$), ya que se trata de un tejido con alta diferenciación celular respecto a tallo y yema; la disminución de peso a partir de tallo podría explicarse mediante lo reportado por Leifert *et al.* (1994), quienes demostraron que la poca

ganancia de peso en tallo se debió a que éste al ser una estructura de conducción de sabia bruta y elaborada la cual se mueve desde la raíz hasta los sitios de demanda en la parte aérea de la planta (Salisbury & Ross, 1994) promueve un contenido de sustancias con pH diferente en los explantes ocasionando que el pH del medio de cultivo se modifique interrumpiendo el crecimiento de los callos, concluyendo que el pH influye directamente en la proliferación y crecimiento de callos. Finalmente al colocar yemas axilares en el medio de cultivo considerando que se trata de zonas meristemáticas éstas se desarrollan dando lugar a partes no embriogénicas las cuales al ser eliminadas disminuyen la ganancia de peso en callo. Bajo estas circunstancias es importante concluir que la generación de callo requiere de un explante inicial, que puede tener una alta diferenciación de sus tejidos (Correia y Canhoto 2010); además el tipo de explante es determinante en la formación de callo ya que mientras más maduro sea sus células constitutivas serán más especializadas (Green, 1983),

La concentración de regulador de crecimiento que promovió el mayor peso de callo en este experimento fue 3.0 mg L⁻¹ la cual superó a 1.0, 10.0 y 0.0 mg L⁻¹ en 21.15, 32.48 y 70.13 %, respectivamente, corroborando lo reportado por Cleland (1995), donde al probar distintas concentraciones de reguladores del crecimiento la concentración óptima fue 3.0 mg L⁻¹.

Al tratarse de segmentos bien diferenciados de la planta, éstos tienen pigmentos propios del órgano los cuales pudieron influir en el color y textura característicos de los callos durante su cultivo y crecimiento *in vitro*. De este modo, al examinar las características físicas de los callos obtenidos se realizó un análisis de frecuencias mediante medidas de tendencia central, en que la moda mostró que el tipo de callo más común en cada uno de los factores estudiados, tanto en color como en textura, se observa que la variedad Arely, la cual presenta una mayor frecuencia de callo tipo 4 (verde clorofílico y semicompacto), al tiempo que la variedad Diego presenta variabilidad de colores y texturas al igual que la variedad PQ2 lo anterior en el medio de cultivo suplementado con 2,4-D, para el caso de TDZ el color más común fue 2 y 3 (cremoso traslúcido y verde clorofílico) y la

textura varía en todas la variedades aunque predomina el tipo 2 y 4 (friable y semicompacto), lo que puede apreciarse de mejor manera en el Anexo 2.

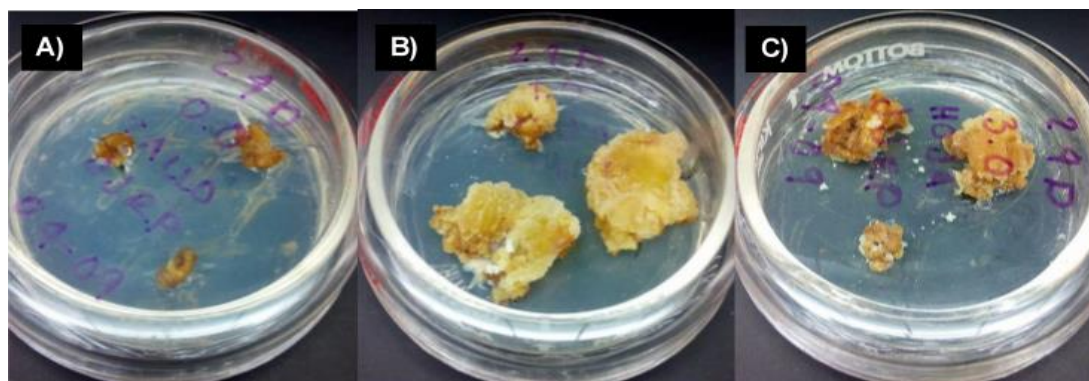


Figura 5 Características de los callos obtenidos en medio de cultivo MS suplementado con 2,4-D (3 sds*) A) Segmentos de tallo 0.0 mg L⁻¹ (5 sds) B) Yemas axilares 3.0 mg L⁻¹ (8 sds) C) Mesófilo de hoja 3.0 mg L⁻¹, crecidos en obscuridad a una temperatura de 27 °C.*semanas después de la siembra.

Los resultados del análisis de varianza para evaluar el efecto de variedades, reguladores del crecimiento y tipo de explantes sobre la regeneración de callos de amaranto (Cuadro 10), muestra que al menos uno de los niveles de los factores tienen efecto ($p \leq 0.01$) sobre la variable respuesta, no así para las interacciones puesto que no son significativas. El coeficiente de variación puede ser considerado como bueno por muchos investigadores, de tal modo que existe una buena confiabilidad de los resultados.

Cuadro 10 Cuadrados medios del análisis de varianza del efecto de variedades, reguladores del crecimiento y tipo de explantes sobre la regeneración de callos de amaranto.

FV	GL	CM
VAR	2	1.6916**
EXP	2	3.5880**
CONC	2	23.995**
VAR(EXP)	4	0.020 ^{NS}
VAR(CONC)	4	0.002 ^{NS}
EXP(CONC)	4	0.004 ^{NS}
VAR(EXP)(CONC)	8	0.005 ^{NS}
ERROR	378	0.084 ^{NS}
TOTAL	404	
CV (%)		20.94

FV=Fuentes de variación; GL=Grados de libertad; CM=Cuadrados medios; CV=Coeficiente de variación; ** Significativo con un $\alpha \leq 0.05$; ^{NS} No significativo.

La diferenciación celular se refiere a las células maduras que tienen una especialización específica y por ende muestran totipotencia en el cultivo *in vitro* (Sponsel, 1995), la cual puede ser afectada por diversos factores. La dediferenciación celular en cambio se encarga de que esas células con una función específica sean capaces de regenerar plantas completas y/o funcionales, Torres *et al.* (1998) demostraron que el subcultivo de los callos embriogénicos en medio fresco permite la rediferenciación celular lo cual recae en el crecimiento o aparición de órganos bien diferenciados.

La comparación de medias muestra que la variedad Arely supera en ganancia de peso a las variedades Diego y PQ2, en 6.75 y 9.02 %, respectivamente (Cuadro 11), al mismo tiempo que el peso de callo originado de fue mayor ($p \leq 0.05$) al de tallo y yema, con diferencias de 9.36 y 12.93 %, respectivamente, en el caso de la concentración se observa que 10.0 mg L⁻¹ tiene la mayor ganancia de peso diferenciándose de 5.0 y 3.0 mg L⁻¹ en 14.96 y 31.51 % respectivamente, características similares que se observan en los reportes de Cleland (1995).

Cuadro 11 Comparación de medias del efecto de variedades, explantes y concentración de TDZ en el peso de callo.

Var.	Peso de callo (g)	Exp.	Peso de callo (g)	Conc. (mg L ⁻¹)	Peso de callo (g)
Arely	2.3856a ^t	Hoja	2.4416a	10.0	2.6744a
Diego	2.2244b	Tallo	2.2129b	5.0	2.2744b
PQ2	2.1704b	Yema	2.1259b	3.0	1.8316c
DMSH	0.0777		0.0777		0.0777

^t Medias con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$); DMSH=Diferencia mínima significativa honesta; Significativo con $\alpha \leq 0.05$; Var=Variedad; Exp=Explante; Conc=Concentración.

La caracterización física de los callos embriogénicos y con base en las medidas de tendencia central y la frecuencia del tipo de callo más común, mostró que el color predominante fue amarillo cafésoso y verde clorofílico en la variedad Arely. Para el caso de la variable textura, los callos cultivados mostraron una consistencia friable y semicompacta en todas las variedades, aunque en algunas la consistencia era compacta dura (Anexo 3). Bajo estas circunstancias se puede concluir, que los callos óptimos para regeneración en plantas completas y

funcionales deben tener un color cremoso traslucido al inicio y verde traslucido en su fase madura así como una textura friable y semicompacta. Los regenerantes obtenidos por medio de callos con las características mencionadas como adecuadas se muestran en la Figura 3.

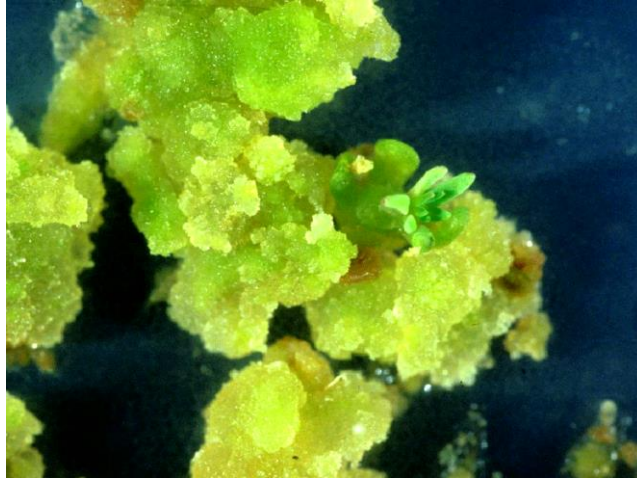


Figura 6 Callo embriogénico, proveniente de mesófilo de hoja de plántulas de amaranto variedad 'Arely', crecido en luz y medio de cultivo MS suplementado con TDZ (10 mg L^{-1}), tres semanas después del subcultivo.

6.2 Ensayo de inducción de callo en embriones maduros

La formación de callos fue afectada significativamente por el genotipo y la composición del medio de cultivo empleado. El origen y crecimiento de callos fue visible dos semanas después de la siembra, iniciando en la región principal del embrión, es decir, el hipocotilo; conforme la estructura creció se observó una relación entre la estructura germinal y la inducción de callos (Figura 4), similar a lo reportado por Mirlohi *et al.* (1989) en arroz (*Oryza sativa* L.) y en *Panicum spp.*, en otro estudio se observó una correlación positiva entre crecimiento de la parte germinal e inducción de callos por embrión maduro (Seo *et al.*, 2008).

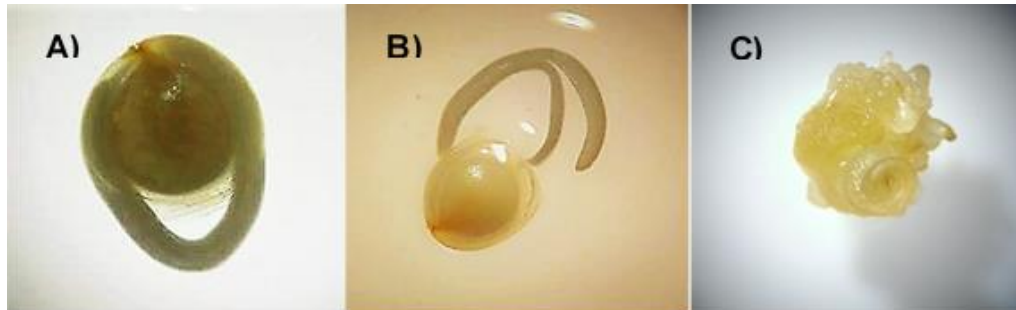


Figura 7 Características de la línea 'PQ2' A) Semilla de Amaranto hidratada, B) Extracción del embrión, se observan los cotiledones del mismo, C) Formación de callo, crecido en oscuridad (27 °C) en medio MS dos semanas después de la siembra.

Cabe hacer hincapié que el análisis del porcentaje de formación de callo en el experimento anterior fue meramente visual, ya que el medio no fue suplementado con reguladores del crecimiento puesto que la finalidad era determinar que genotipo era el más adecuado para inducir callos a partir de embriones maduros, que en este caso fue 'PQ2'.

Cuadro 12 Resultados correspondientes al porcentaje de inducción de callo.

Genotipo donador de los embriones	Número de embriones usados	Respuesta	
		Número de embriones con formación de callo	% de formación de callo ^a
Diego	50	19	38
Arely	50	23	46
PQ2	50	43	86

^a El porcentaje de formación de callo fue evaluado contando el número de embriones que formaron callo con respecto al número total de embriones x 100.

6.3 Callogénesis en embriones maduros de Amaranto

El análisis de varianza que se muestra en el Cuadro 13 arrojó que al menos uno de los niveles del factor tuvo efecto sobre la variable respuesta, mientras que el coeficiente de variación (19.97 %) está en el rango que determina una buena confiabilidad de los resultados.

Cuadro 13 Cuadrados medios del análisis de varianza del efecto de la concentración de maltosa y glucosa (fuentes de carbono) sobre inducción de callos en amaranto.

FV	GL	CM	CV (%)
TRAT	2	1.98**	19.97
ERROR	186	0.0003	
TOTAL	188		

FV=Fuentes de variación; GL=Grados de libertad; CM=Cuadrados medios; CV=Coeficiente de variación; ** Significativo con un $\alpha \leq 0.05$.

Los tipos de callo que fueron encontrados a partir de embriones maduros de amaranto se ilustran en la Figura 2. La diferenciación celular es el proceso mediante el cual una célula se convierte en otro tipo celular más especializado, el cual conserva toda la información genética de la planta madre pero es incapaz de producir una planta funcional.

En este experimento la toma de datos se realizó de forma semanal y con base en la comparación de medias reportada en el cuadro 14, se muestra que el tratamiento tres tuvo una mayor ganancia de peso, cuyo comportamiento se mantiene a través de las cuatro semanas que implica el lapso de cultivo en medio de inducción de callos. Así bien, se observó mayor variabilidad física de callos en el medio suplementado con una concentración de Maltosa y Glucosa de 20 y 5 g L⁻¹ respectivamente comparados con los suplementados con concentraciones mayores. Callos morfológicamente similares a los observados fueron reportados por Wang *et al.* (2010) para *Zoysia spp.*

Cuadro 14 Comparación de medias del efecto de la concentración de maltosa y glucosa en el peso de callos, medio de inducción.

Tratamiento	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)	Peso 3 (g)	Peso 4 (g)
T3	0.1511a ^t	0.2290a	0.3429a	0.4370a
T2	0.0909b	0.1473b	0.1864b	0.2241b
T1	0.0239b	0.0505b	0.0633b	0.0848b
DMSH	0.0075	0.0075	0.0075	0.0075
CV	19.97	12.43	8.95	4.02

^t Medias con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$); DMSH=Diferencia mínima significativa honesta; T1: 40 mg L⁻¹ maltosa y 10 mg L⁻¹ glucosa; T2: 30 mg L⁻¹ maltosa y 7.5 mg L⁻¹ glucosa; T3: 20 mg L⁻¹ maltosa y 5 mg L⁻¹ glucosa.

En el caso de la caracterización física de los callos ésta se realizó con la finalidad de conocer cuál fue el tipo de callo característico respecto a las concentraciones de fuente de carbono en la inducción de callos a partir de embriones maduros de semillas de amaranto. Puede observarse que predomina el callo tipo 2 el cual presenta textura friable y color predominante que va de cremoso traslucido a

amarillo esto para el tratamiento 3 que fue el mejor de ellos de acuerdo la comparación de medias (Anexo 4).

En la fase de desdiferenciación celular, la prueba de medias mostró un incremento de peso de 17 % respecto a la comparación de medias anterior. Se observa en el cuadro 15 que el tratamiento tres promueve nuevamente la ganancia de peso ($p \leq 0.05$) y se mantiene como el mayor a través del lapso de cultivo (dos semanas) siendo éste el mejor de los niveles del factor concentración de fuente de carbono.

La desdiferenciación es un proceso que se traduce en un crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células indiferenciadas denominada callo, la cual bajo las condiciones adecuadas es capaz de generar órganos o embriones somáticos, mismos que al regenerar plantas funcionales éstas presentan características que pueden ser utilizadas en programas de mejoramiento vegetal,

Cuadro 15 Comparación de medias del efecto de la concentración de maltosa y glucosa en el peso de callos, medio de desdiferenciación.

Tratamiento	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)
T3	0.4396a ^t	0.5104a
T2	0.2284b	0.3000b
T1	0.0848c	0.1192c
DMSH	0.0005	0.0005
CV	58.64	52.03

^t Medias con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$); DMSH=Diferencia mínima significativa honesta; T1: 40 mg L⁻¹ maltosa y 10 mg L⁻¹ glucosa; T2: 30 mg L⁻¹ maltosa y 7.5 mg L⁻¹ glucosa; T3: 20 mg L⁻¹ maltosa y 5 mg L⁻¹ glucosa.

En el caso de las pruebas de frecuencia para caracterizar físicamente los callos obtenidos puede observarse que predomina el callo tipo 2 el cual presenta textura friable y color predominante que va de cremoso traslucido a amarillo esto para el tratamiento 3 que fue el mejor de ellos de acuerdo con la comparación de medias (Anexo 5).

Los callos embriogénicos obtenidos a partir del medio de regeneración suplementado con una concentración de Maltosa y Glucosa de 20 g L⁻¹ y 5 g L⁻¹ respectivamente presentaron mayor frecuencia numérica de coloración verde clorofílica al estar inmersos en medio de regeneración, comparado con los medios de inducción suplementados con concentraciones mayores de las mismas fuentes de carbono. Similarmente a lo reportado en trigo (*Triticum aestivum* L.) (Ul-Hassan *et al.*, 2009), y en cacao (*Theobroma cacao* L.), (López-Báez *et al.*, 2000) donde se evaluaron tres fuentes de carbono sacarosa, maltosa y glucosa a diferentes concentraciones, reportan que al incrementar la concentración de Maltosa y glucosa (50 g L⁻¹) los callos mueren, mientras que al utilizar concentraciones menores de las mismas los callos se producen de manera óptima. Los callos embriogénicos obtenidos mostraron coloraciones de verde clorofílico a amarillo pálido o amarillo, de estructura semicompacta, con forma nódulo globular, y relativamente secos; en contraste, los callos no embriogénicos presentaron color amarillo cafésoso, con texturas envueltas en mucilago, de forma irregular, acuosas en apariencia y de mayor desarrollo (Anexo 6).

Con base en los resultados del cuadro 16, se observa que el tratamiento supera a los tratamientos restantes a través de las tres semanas de toma de datos, situación similar a lo observado en los cuadros 14 y 15. En el caso de las frecuencias numéricas (Anexo 6), puede observarse que predominan los callos tipo 2 y 4, los cuales presentan colores que van de cremoso traslúcido a amarillo, de textura semicompacta y un mayor tamaño que los característicos de los medios anteriores, esto para el tratamiento 3 que fue el mejor de ellos de acuerdo con la comparación de medias.

Cuadro 16 Comparación de medias del efecto de la concentración de maltosa y glucosa en el peso de callos, medio de regeneración.

Tratamiento	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)	Peso 3 (g)
T3	0.5071a ^t	2.0033a	3.3623a
T2	0.3008b	1.2686b	2.2928b

T1	0.1192c	0.3387c	0.5675c
DMSH	0.0005	0.0040	0.0118
CV	51.72	56.76	55.66

^t Medias con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$); DMSH=Diferencia mínima significativa honesta; Significativo con $\alpha \leq 0.05$; T1: 40 mg L⁻¹ maltosa y 10 mg L⁻¹ glucosa; T2: 30 mg L⁻¹ maltosa y 7.5 mg L⁻¹ glucosa; T3: 20 mg L⁻¹ maltosa y 5 mg L⁻¹ glucosa.

Considerando las características físicas de los callos descritas anteriormente, se tiene que para obtener un callo embriogénico, es decir, que presente estructuras vegetativas mismas que generen plantas funcionales, es ideal que éstos tengan textura o consistencia friable o semicompacta, así como un color que vaya de cremoso traslucido o amarillo a verde clorofílico (Figura 3).

Realizando una comparación entre explantes provenientes de material vegetal (plántulas) y embriones maduros, se observó en los estadísticos referentes al uso de diferentes variedades, tipos de explante y concentración de reguladores del crecimiento que todos presentan respuesta morfogénica al medio de cultivo, no obstante si se desea obtener mejores características resulta conveniente utilizar como explantes segmentos de hoja de la variedad Arely sembrándolos en medio de cultivo suplementado con 2,4-D a una concentración de 3.0 mg L⁻¹. Por otro lado el embrión al ser un tejido de reproducción muestra mejores características en cuanto a incremento de peso, textura y color además de que el lapso de cultivo es menor respecto a explantes de hoja, tallo o yema axilar.

7 CONCLUSIONES

Se obtuvo la formación de callos embriogénicos, a partir de explantes de mesófilo de hoja, tallo, yema axilar y embriones maduros de tres variedades de Amaranto. La composición del medio y las concentraciones de reguladores del crecimiento (2,4-D 3.0 mg L⁻¹ y TDZ 3.0 mg L⁻¹) y fuentes de carbono (Maltosa 20 mg L⁻¹ y Glucosa 5.0 mg L⁻¹) utilizadas fueron óptimas para la obtención de los mismos, no así para una regeneración en plantas completas eficiente lo que permitió anular la influencia del genotipo utilizado.

La mejor respuesta para inducción de callo fue observada en explante de mesófilo de hoja para la variedad 'Arely' y en embrión maduro para la variedad 'PQ2'. Las características óptimas del callo para posibles regenerantes incluye el color cremoso translucido y consistencia friable en la fase de inducción, para las fases de dediferenciación y regeneración se considera adecuado que los callos posean un color cremoso translucido o verde clorofílico y una textura friable y semicompacta.

Estas variedades podrían ser utilizadas como modelo de estudio para cultivo de tejidos y mejoramiento asistido por ingeniería genética, tomando en cuenta que con el protocolo de regeneración adecuado se podrían obtener variaciones benéficas para la especie.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Abebe, D. Z., Teffera, W. & Machuka, J. S. (2008). Regeneration of tropical maize lines (*Zea mays* L.) from mature zygotic embryo through callus initiation. *African Journal of Biotechnology*, 7, 2181-2186.
- Acosta, M., Alvarado, Y., Cruz, M., Leiva, M. & Delgado, L. (2005). Micobiota epífita y contaminantes fungosos del establecimiento *in vitro* de *Eucalyptus granáis*. *Manejo integrado de plagas y agroecología*, 75, 60-63.
- Aguado-Santacruz G. A., Cabrera-Ponce, J. L., Olalde-Portugal, V., Sánchez-González, M. R., Márquez-Guzmán, J. & Herrera- Estrella, L. (2001). Tissue Culture and plant regeneration of blue grama grass, *Bouteloua gracilis*. *In vitro Celular & Developmental Biology-Plant Sciences*, 37, 182-189.
- Aina O., Quesenberry, K. & Gallo, M. (2012). Thidiazuron-induced tissue culture regeneration from quartered-seed explants of *Arachis paraguariensis*. *Crop Science*, 52, 1076-1083.
- Al-Abed, D., Rudrabhatla, S., Talla, R. & Goldman, S. (2006). Split-seed: a new tool for maize researchers. *Planta*, 223, 1355-1360.
- Albornoz, L., Fernández, L., León, S. & Castro, C. (1993). *Efecto del tratamiento de plantas donantes y del número de explantes a utilizar para el control de la contaminación y ennegrecimiento en el cultivo in vitro de Annona muricata* L. Maracaibo, Venezuela. 23 p.
- Alvarado, Y. (1998). Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En Pérez, J. N. (ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología* (pp. 81 – 104). Santa Clara. Cuba.
- Ammirato, P.V. (1983). Embryogenesis. En Evans, D.A., Sharp, W. R., Ammirato, P. V. & Yamada, Y. (Eds), *Handbook of plant cell culture techniques for propagation and breeding*. (pp. 82-123). New York: Macmillan Publishing Company.

- Arellano, V. J. L. (2001). *El amaranto, un cultivo alternativo de alta calidad nutritiva*. En: Memoria Técnica No. 1. SAGARPA INIFAP-CIR CENTRO. (pp. 51-59). México. Ed. Chapingo.
- Armstrong, C. L. & Green, C. E. (1984). Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta*, 164, 207-214.
- Armstrong, C. L. & Phillips, R. L. (1988). Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated of organogenic and friable, embryogenic tissue cultures of maize. *Crop Science*, 28, 363-369.
- Bernal-Flores, A., Quero-Carrillo, A. R., Pérez-Rodríguez, P., Wang, Z. Y., Zavaleta-Mancera, H. A. & Ortega-Cerrilla, M. E. (2013). *Callos Suaves Incrementan la Eficiencia de Regeneración Bouteloua curtipendula*. Texcoco, Edo de Mexico: MundiPrensa. pp. 160 – 164.
- Bhaskaran, S. & Smith, R. H. (1990). Cell biology & molecular genetic regeneration in cereal tissue culture: A review. *Crop Science*, 30, 1328-1336.
- Boget, N., Torné, J. M., Willadino, L. & Santos, M. (1995). Variations in endogenous polyamine content of maize calli obtained from zygotic and androgenetic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 40, 139-144.
- Breene, W. M. (1991). Food uses of grain amaranth. *Certificate Foods World*, 36, 426-430.
- Bronsema, F. B. F., van Oostveen, W. J. F. & van Lammeren, A. A. M. (1997). Comparative analysis of callus formation and regeneration on cultured immature maize embryos of the inbred lines A188 y A632. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 50, 57-65.
- Broome, O. C. & Zimmerman, R. H. (1978). *In vitro* propagation of blackberry. *HortScience*, 13, 151-153.
- Casas, A., Kononowicz, A. M., Zehr, B. U., Tomes, D. J., Axtell, J. D., Butler, L. G. & Bressan, R. A. (1993). Transgenic sorghum plants via microprojectile

- bombardment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90, 212- 216.
- Cassells, A. C. & Curry, R. F. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 64, 145-157.
- Cassells, A. C. (1991). Problem in tissue culture: culture contamination. En: Debergh P. & Zimmerman, R. H. (Eds), *Micropropagation* (pp. 31-45). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Cheng, M., Fry, J.E., Pang, S., Zhou, H., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, T.W. & Wan, Y. (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*, 115, 971-980.
- Christianson, M. L. & Hornbuckle, J. S. (1999). Phenylurea cytokinins assayed for induction of shoot buds in the moss *Funaria hygrometrica*. *American Journal of Botany*, 86, 1645-1648
- Claudebon, M., Gendraud, M. & Franclet, A. (1988). Roles of phenolic compounds on micropropagation of juvenile and mature clones of *Sequoiadendron giganteum*: Influence of Activated Charcoal. *Scientia Horticulturae*, 34, 283-291.
- Cleland, D. I. (1995). Leadership and the project management body of knowledge. *International Journal of Project Management*, 13, 83-88.
- Correia, S. & Canhoto, J. (2010). Characterization of somatic embryo attached structures in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). *Protoplasma*, 242, 95-107. DOI: 10.1007/s00709-010-0130-z.
- Cruz, M., Acosta, M., Leiva, M., Alvarado, Y. & Lezcano, M. (2002). Evaluación del efecto del complejo carbendazim- β -ciclodextrina para el control de hongos filamentosos. Contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas. *Biotecnología Vegetal*, 2, 73-76.

- Dalal, M. A., Sharma, B. B. & Srinivasa, M. (1992). Studies on stock plant treatment and initiation culture mode in control of oxidative browning *in vitro* cultures of grapevine. *Scientia Horticulturae*, 51, 35-41.
- Dodds, J.H. (1985). *Experiments in Plant Tissue Culture*. New York. Academic Press Inc. 375 p.
- Feeney, M., Bhagwat, B., Mitchell, J. & Lane, W. (2007). Shoot regeneration from organogenic callus of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90, 201–214.
- Furter, D., Kasran, R., Tan, C., Johnsiul, L., Mohanmed, A., Hartney, Y., Yusof, M., Lamín, K. & Tong, L. (2000). *Biotechnology research by the Malaysia cocoa Board*. Londres: Ingenie. pp.143 – 148.
- George, E. F. (1993). *Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology. Components of culture media*. Edington, Wilts. England: The Exergetics Ltd. pp. 881 – 889.
- George, F. & Slierrington. P. (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Basingtoks, England. 231 p.
- Gray, W. M. & Estelle, M. (1998). Biochemical genetics of plant growth. *Current Opinion in Biotechnology*, 9, 196 201.
- Green, C. E. (1983). Tissue Culture methods in *Zea mays* and their utilization in crop improvement. *Votr Pflanzenzüchtg*, 2, 25-34.
- Haliloglu, K. & Baenziger, P.S. (2005). Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from immature embryo cultures. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 14, 155-160.
- Hildebrandt, V. & Haniey, P. M. (1988). Factors affecting the release of fenolic exudate from explants of *Pelargonium x hortorum*. Bailey Sprinter Scarlet. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 63, 651-657.

- Hu, T., Metz, S., Chay, C., Zhou, H.P., Biest, N., Chen, G., Cheng, M., Fena, X., Radionenko, M., Lu, F. & Fry, J. (2003). Agrobacterium-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. *Plant Cell Reports*, 21, 1010-1019.
- Hu, X. R., Yang, A. F., Zhang, K. W., Wang, J. & Zhang, J. R. (2006). Optimization of *in vitro* multiple shoot clump induction and plantlet regeneration of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84, 89-98.
- Huang, X. & Wei, Z. (2004). High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.). *Plant Cell Reports*, 22, 793-800.
- Huják, J. & Salak, J. (2010). Effect of Low Temperatures on the Structure of Plant Cells In Mohammad Pessarakli (ed.). *Handbook of Plant and Crop Stress* (pp. 441-464). New York: CRC Press.
- Hurtado, D. V. & Merino, M. E. (1991). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. México: Ed. Trillas. 92 p.
- Hussain, S., Lañe, S. & Price, D. (1994). A preliminary evaluation of the use of culture filtrates for the control of contaminants in plant tissue culture systems. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 36, 45-50.
- Jain, S.M. (2001). Tissue culture derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118, 153-166.
- Jelenic, S., Berljak, J., Papes, D. & Jelaska, S. (2001). Mixoploidy and chimeric structures in somaclones of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Bintje. *Food Technology and Biotechnology*, 39, 13-17.
- Jia, X. X., Zhang, J. W., Wang, H. N. & Kong, W. P. (2008). Efficient maize (*Zea mayz* L.) regeneration derived from mature embryos *in vitro*. *Maydica*, 53, 239-248.

- Karp, A. (1995). Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica*, 85, 295-302.
- Krasensky, J. & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 25, 1-16.
- Krishna, M. P., Tula, S., Kamrul, H. K., Srivastava, V. K. & Tuteja, N. (2013). An efficient and rapid regeneration via multiple shoot induction from mature seed derived embryogenic and organogenic callus of Indian maize (*Zea mays* L.). *Plant Signaling & Behavior*, 8, 135-158.
- Kubota, C. & Tadokoro, N. (1999). Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. *In vitro Cell and Developmental. Biología Plantarum*, 35, 296-298.
- Larson, C., Gómez, C., Sánchez, M. & Ríos, D. (2006). Inducción de callogénesis indirecta en *Eucalyptus globulus*. *Bosque*, 27, 250-257.
- Lassaga, S. (2002). *Cultivo in vitro de anteras de lino: Análisis genético de las respuestas en las etapas que conducen a la formación de plántulas y determinación del origen de las mismas*. Tesis. Instituto nacional de tecnología agropecuaria. Balearse, Buenos Aires, Argentina.
- Lee, M. & Phillips, R. (1988). The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 39, 413-437.
- Leifert, C. & Cassells, A. C. (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 37, 133-138.
- Leifert, C. & Woodward, S. (1998). Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 52, 83-88.
- Leifert, C., Morris, C. E. & Waites, W. M. (1994). Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for

- contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13, 139- 183.
- Lestari, E.G. (2006). *In vitro* selection and somaclonal variation for biotic and abiotic stress tolerance. *Biodiversitas*, 7, 297-301.
- Marcano, D. & Pire, A. (1993). Evaluación de diferentes desinfectantes y funguicidas en el control de sarna común *Streptomyces scabies* en semilla prebásica de para *Solanum tuberosum* L. *Agronomía Tropical*, 43, 203-215.
- Marín, J. A. (1993). Micropropagación de especies frutales. *Horto Fruticultura*, 1, 56-62.
- Marks, T. R. & Simpson, S. E. (1990). Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stock plants to darkness or low levelss of irradiance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 65, 103-111.
- Martínez, S. (1995). Evaluación de poblaciones obtenidas por cultivo *in vitro* e inducción de mutaciones en plátanos (*Musa* sp). *Centro Agrícola*, 19, 93-96.
- Meyer, H., Staden, V., Alien, S. & Van Staden, J. (1992). The use of antibiotics to control systemic bacteria *in vitro* cultures of *Piper nigrum* cv. Kuching. South African. *Journal of Botany*, 58, 500-504.
- Meyer, M. M. (1984). A new method for propagating Woody plants from tissue culture. *The Azalean*, 6, 13-15.
- Mirlohi A. F., Thompson, L. F., Dilday, R. H., Huang, F. H. & Al- Khayri, J. M. (1989). *In vitro* culture of several rice cultivars. *Proceedings of the Arkansas Academy of Science*, 43, 55-56.
- Moreira, G., Da Silva, M.H. & Debergh, P.C. (1997). The effect of light quality on the morphogenesis of *in vitro* cultures of *Azorella vidalii* (Wats.) Feer. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51, 187-193.

- Muhitch, M. J & Fleycher, J. (1985). Influence of culture age and speimidine-treatment on the accumulation of phenolic compounds in suspension cultures. *Plant Physiology*, 78, 25-28.
- Muoma, J., Muluvi, G. & Machuka, J. (2008). *In vitro* regeneration by indirect organogénesis of selected kenyan maize genotypes using shoot apices. *Biotechnology*, 7, 732-738.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Murashige. T. (1974). Plant Propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*, 25, 135-166.
- Nahdi, S. & de Wet, J. M. J. (1995). *In vitro* regeneration of Sorghum bicolor lines from shoot apices. *International Sorghum and Millets Newsletter*, 36, 88-90.
- Niedz, R. P. & Bausher, M. G. (2002). Control *in vitro* contamination of explants from greenhouse and fields grown trees. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 38, 468-471.
- Novat, F. J., Afza, R., & Van Durein, M. (1988) *Mutagénesis in vitro para el mejoramiento del banano y el plátano (Musa sp)*. Panamá City. 53 p.
- O'Connor-Sánchez, J. L., Cabrera-Ponce, M., Valdez-Melara, P., Téllez-Rodríguez, J. L., Pons-Hernández, J. & Herrera-Estrella, L. (2002). Transgenic maize plants of tropical and subtropical genotypes obtained from calluses containing organogenic and embryogenic-like structures derived from shoot tips. *Plant Cell Reports*, 21, 302–312.
- Okole, B., Memela, C., Rademan, S. & Kunert, K. J. (2000). Non-conventional breeding approaches for banana and plantain improvement against fungal diseases at Aeci. *Acta Horticulturae*, 540, 207- 214.
- Orellana, P. (1998). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Concentración de sacarosa*. CU: Ed Villa Clara. 151 p.

- Pérez, P. J. N. (1998). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Cuba: Ed. Instituto de Biología de Plantas. Santa Clara. 75 p.
- Posposilova, J., Ticha, I., Kadlecek, P., Haisel, D. & Plzakova, S. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum*, 42, 481-497.
- Pruski, K., Kozai, T., Lewis, T., Astatkie, T. & Nowak, J. (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, 215-221.
- Rakshit, S., Rashid, Z., Sekhar, J. C., Fatma, T. & Dass, S. (2010). Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100, 31-37.
- Raman, K., Walden, D. B. & Greyson, R. I. (1980). Propagation of *Zea mays* L. by shoot tip culture: a feasibility study. *Annals of Botany*, 45, 183-189.
- Ramírez, M., Santos, R. & Isea, F. (2000). Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava* L. *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ*, 17, 217-225.
- Rashmi, R. & Trivedi, M. (2014). Effect of Various Growth Hormone Concentration and Combination on Callus Induction, Nature of Callus and Callogenic Response of *Nerium odorum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105, 117–126. DOI 10.1007/s12010-013-0693-1.
- Read, P. & Economou, A. (1987) Stock plant influence on tissue culture success. *Acta Horticulturae*, 212, 111.
- Roca, W. & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos, embriogénesis somática y organogénesis*. Cali, Colombia: CIAT. 1039 p.

- Roca, W. M. & Mroginski, L. A. (1993). *Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: Ed. CIAT. 1039 p.
- Rosati, C., Landi, P. & Tuberosa, R. (1994). Recurrent selection for regeneration capacity from immature embryo derived calli in maize. *Crop Science*, 34, 343-347.
- Sairam, R. V., Parani, M., Franklin, G., Lifeng, Z., Smith, B., MacDougall, J., Wilber, C., Sheikhi, H., Kashikar, N., Meeker, K., Al-Abed, D., Berry, K., Vierling, R. & Goldman, S. L. (2003). Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation. *Genome*, 46, 323–329.
- Sairam, R. V., Seetharama, N., Devi, P. S., Verma, A., Murthy, U. R. & Potrykus, I. (1999). Plant regeneration from mesophyll protoplasts in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Plant Cell Reports*, 18, 972-977.
- Sala, F. & Labra, M. (2003). Somaclonal variation. In Thomas, B., Murphy, D. J. & Murray, B. (Eds). *Encyclopedia Applied Plant Science* (pp. 1417-1422). Oxford, UK. Academic Press Elsevier.
- Salisbury, F. B., & Ross, C.W. (1994). *Fisiología Vegetal*. México: Grupo Editorial Iberoamerica. 388 p.
- Sánchez-Chiang, N. & Jiménez, V. M. (2010). Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*, 21, 193-205.
- Santana, B.N. (1993). *Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (Coffea sp.)*. Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). INCA. La Habana.
- Santos, M. A., Camara, T., Rodríguez, P., Claparols, I. & Torné, J. M. (1996). Influence of exogenous proline on embryogenic and organogenic maize callus subjected to salt stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47, 59-65.
- Sauer, J. D. (1967). The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographical survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 54, 103-137.

- Sauer, J. D. (1969). Identity of archaeological grain amaranths from the valley of Tehuacan, Puebla, Mexico. *American Antiquity*, 34, 80-81.
- Seetharama, N., Sairam, R. V. & Rain, T. S. (2000). Regeneration of sorghum from shoot tip cultures and field performance of the progeny. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61, 169-173.
- Sidorov, V., Gilberston, L., Addae, P. & Duncan, D. (2006). Agrobacterium-mediate transformation of seedling-derived maize callus. *Plant Cell Report*, 25, 320-328.
- Soriano, S. J. (1993). Caracterización parcial de un concentrado proteínico del grano de amaranto. *Ciencia*, 44, 517-525.
- Sponsel, V. M. (1995). Gibberellin biosynthesis and metabolism. In Davies, P.J. (ed.), *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (pp. 66-97). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Stefanello, S., Dal Vesco, L., Ducroquet, J., Nodari, R. & Guerra, M. (2005). Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). *Scientia Horticulturae*, 105, 117-126.
- Sticklen, M. B. & Oraby, H. F. (2005). Shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformaron of cereal crop. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 41, 187-200.
- Street, H. E. (1979). *Embryogenesis and chemically induced organogenesis. En: Plant Tissue and Cell Culture. Principals applications*. Columbus University. 75 p.
- Strosse, H., Domergue, R., Panis, B., Escalant, J. V. & Cote, F. (2003). *Banana plantain embryogenic cell suspensions*. Technical Guidelines. Francia. INIBAP. 27 p.
- Surga, J. G. & Guevara, Y. (1994). Pruebas de desinfección para controlar la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de ápices caulinares de banano (*Musa AAA*). *Fitopatología Venezolana*, 7, 14-17.

- Tabares, L. R., Magalhaes, J. R., Ariano, M. R. & José. A.R. (2004). Indirect organogenesis of rice explants from meristematic region of shoot tips. *Brasilian Agrociencia*, 10, 203-207.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. 3rd edition. Sunderland, MA. Sinauer Associates. pp. 67 – 86.
- Theocharis, A., Clément, C. & Barka, E. (2012). Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*, 235, 1091-1105.
- Torres, A.C., Caldas, L. A. & Buso, J. A. (1998). *Cultura de Tecidos e Transformacao Genética de Plantas*. (Vol.1) Embrapa. Brasil. Ed. Brasilia. 53 p.
- Ul-Hassan M., Ahmed, Z., Munir, M., Malik, S. I. & Shahzad, K. (2009). Effect of sorbitol in callus induction and plant regeneration in wheat. *African Journal of Biotechnology*, 8, 6529-6535.
- Usue, K., Okabe, K., Permillo, R. & Ramírez, A. (1996). *Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Guatemala: ICTA/JOV. 35 p.
- Vasil, I. K. & Vasil, V. (1991). Embryogenic callus, cell suspension and protoplast cultures of cereals. In Lindsey, K. (ed.), *Plant Tissue Culture Manual*. (pp. 1-16). Kluwer Academic Publishers
- Vasil, V. & Vasil, I. (1984). Induction and maintenance of embryogenic callus cultures of gramineae. En: Vasil, I. (Ed.). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (pp. 36-41) New York. Academic Press Inc.
- Vieitez, A. M. & Vieitez, E. (1980). Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut grown *in vitro*. *Physiology Plant*, 50, 127-130.
- Wang, A. S. (1987). Callus induction and plant regeneration from maize mature embryos. *Plant Cell Reports*, 6, 360-632.
- Wang, J., Li, C. & Wang, E. (2010). Potential and flux landscapes quantify the stability and robustness of budding yeast cell cycle network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 107, 195 – 200.

- Wu, H., Sun, M., Yue, S., Sun, H., Cai, Y., Huang, R., Brenner, D. & Corke, H. (2000). Field evaluation of an *Amaranthus* genetic resource collection in China. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47, 43-53.
- Yu, D. & Meredith, C. P. (1986). The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 2, 972-975.
- Zapata, F.B. (1994). *Estudio morfohistológico y bioquímico de la embriogénesis somática en Coffea canephora var. Robusta*. Trabajo de Diploma. UNAH. La Habana.
- Zhong, H., Srinivasan, C. & Stiklen, M. B. (1992). *In vitro* morphogenesis of corn (*Zea mays* L). I. Differentiation of multiple shoot clumps and somatic embryos from shoot tips. *Planta*, 187, 483-489.

9 ANEXOS

Anexo 1

Cuadro 17 Composición mineral de los medios de cultivo más utilizados.

Compuesto	Medio base ¹⁾		
	MS	N6	B5
NH ₄ NO ₃	1,650	---	---
KNO ₃	1,900	2,830	2,500
KH ₂ PO ₄	170	400	---
CaCl ₂ *2H ₂ O	440	166	150
(NH ₄) ₂ SO ₄	---	463	134
MgSO ₄ *7H ₂ O	370	185	250
NaH ₂ PO ₄ *4H ₂ O	---	---	150
KI	0,83	0,80	0,75
MnSO ₄ *H ₂ O	---	---	10,00
H ₃ BO ₃	6,20	1,60	3,00
MnSO ₄ *4H ₂ O	22,30	4,40	---
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,60	1,50	2,00
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,25	---	0,25
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	---	0,025
FeSO ₄ *7H ₂ O	27,80	27,85	27,80
Na ₂ EDTA	37,30	37,25	37,30
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025	---	0,025
Glicina	2,00	2,00	---
Tiamina –HCl	0,10	1,00	10,00
Piridoxina –HCl	0,50	0,50	1,00
Ácido Nicotínico	1,00	0,50	0,50
Mioinositol	100,00	---	100,00
Sacarosa	30,000	50,000	20,000
pH	5,7	5,8	5,5

¹⁾ Composición en miligramos.

MS: Medio de Murashige y Skoog (1962).

N6: Medio de Chu, C. C., Wang, C. C., Sun, C. S., Hsu, C., Yin, K. C. & Chu, C. (1975).

B5: Medio de Gamborg, O. L., Miller, R. A. & Ojima, K. (1968).

Anexo 2.

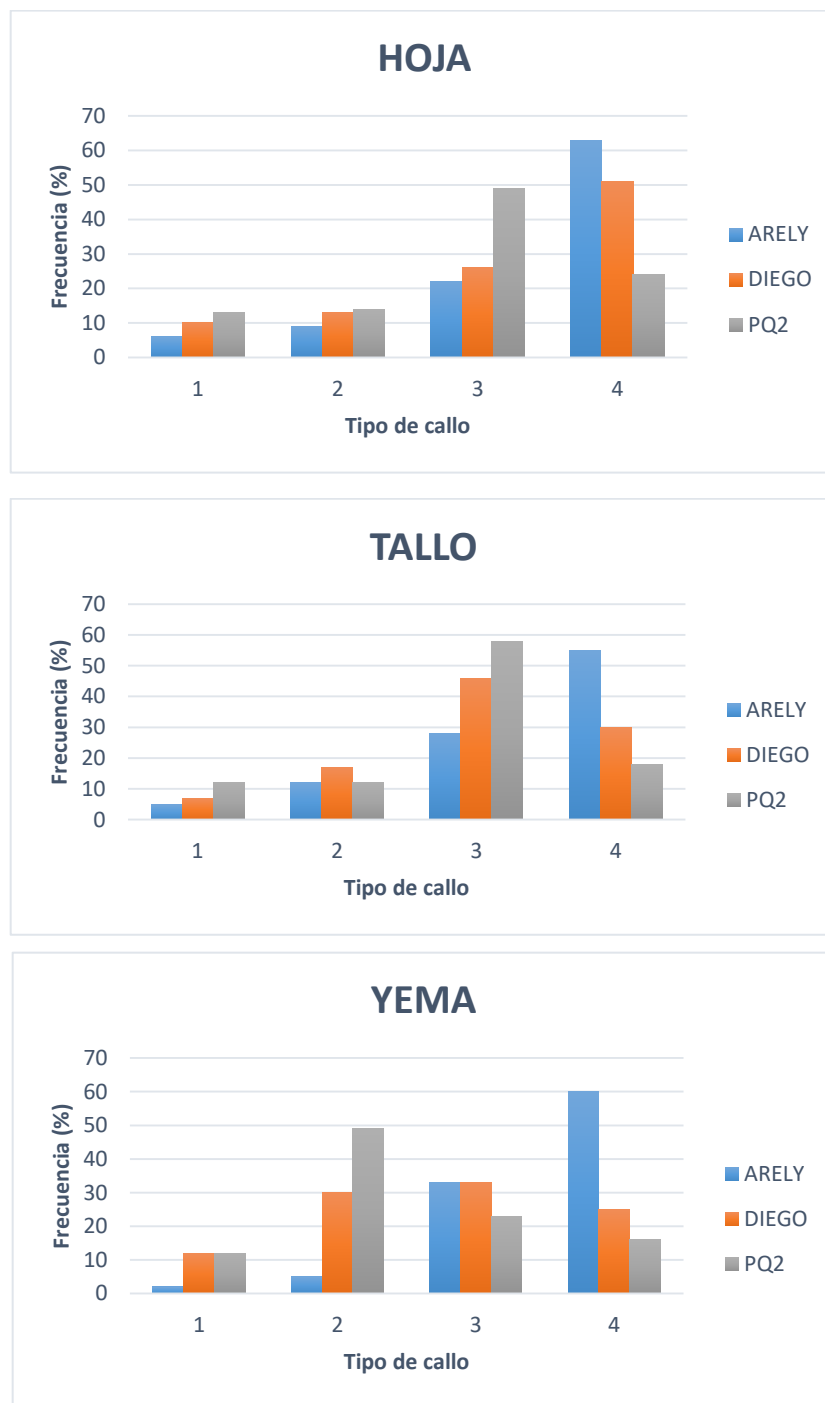


Figura 8 Gráficos de frecuencia para la variable color, el regulador del crecimiento es 2,4-D los tipos de callo son 1 = Amarillo; 2 = Cremoso traslúcido, 3 = Amarillo cafésoso; 4 = Verde clorofílico.

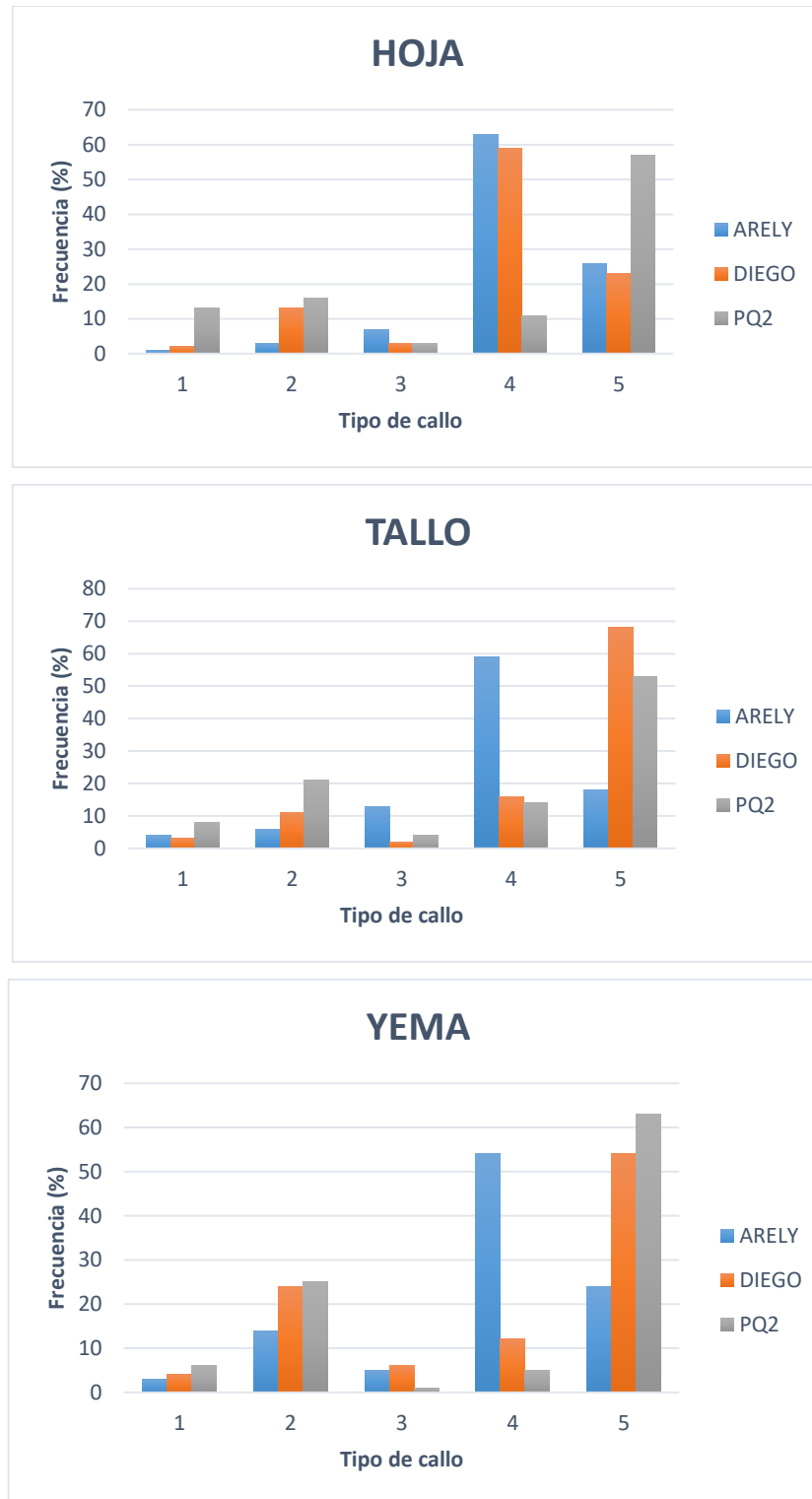


Figura 9 Gráficos de frecuencia para la variable textura, el regulador del crecimiento es 2,4-D los tipos de callo son 1 = Suave acuoso; 2 =Friable, 3 = Envuelto en mucílago; 4 =Semicompacto; 5 = Compacto duro.

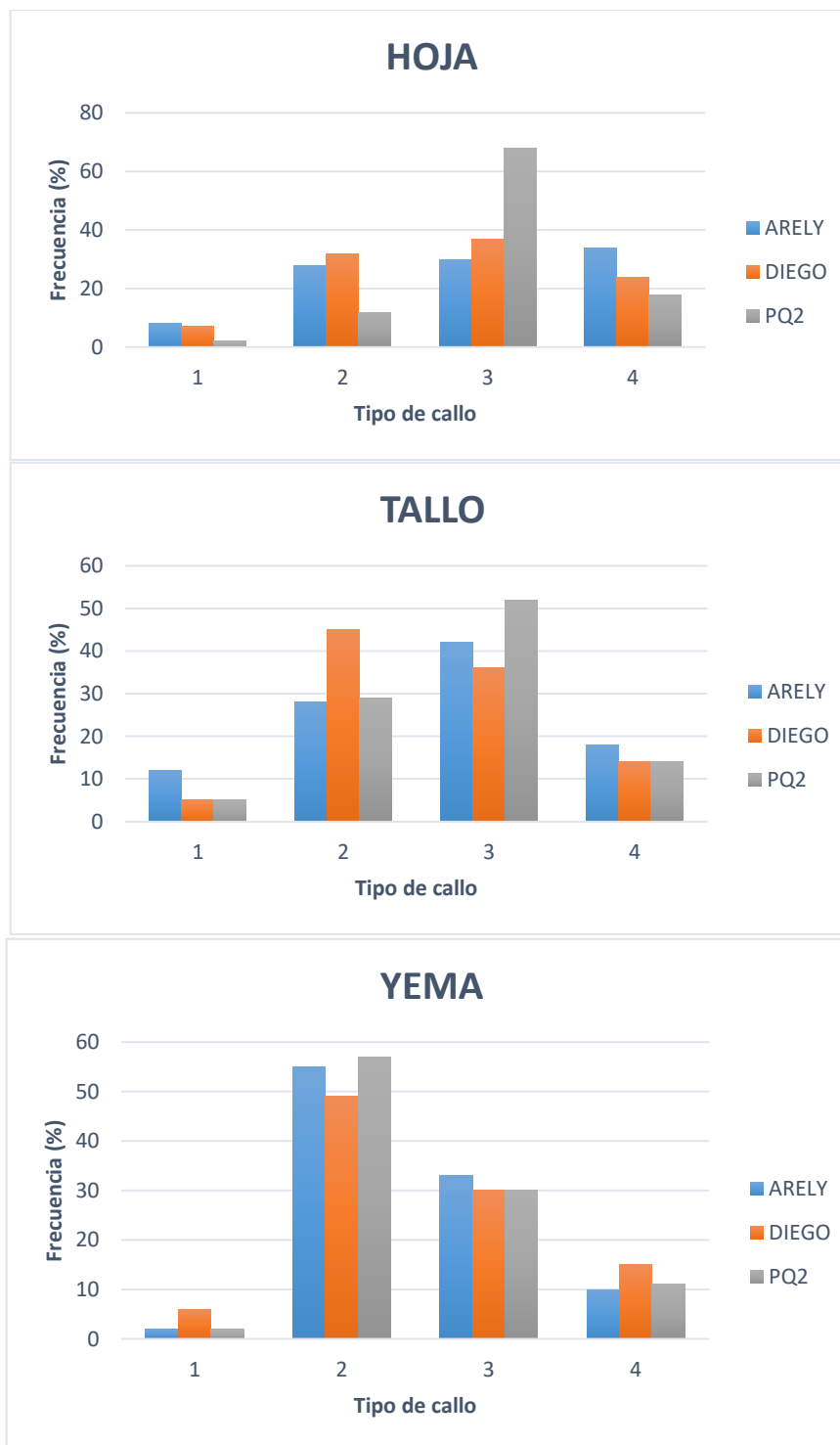


Figura 10 Gráficos de frecuencia para la variable color, el regulador del crecimiento es TDZ los tipos de callo son 1 = Amarillo; 2 = Cremoso traslúcido, 3 = Amarillo cafésoso; 4 = Verde clorofílico.

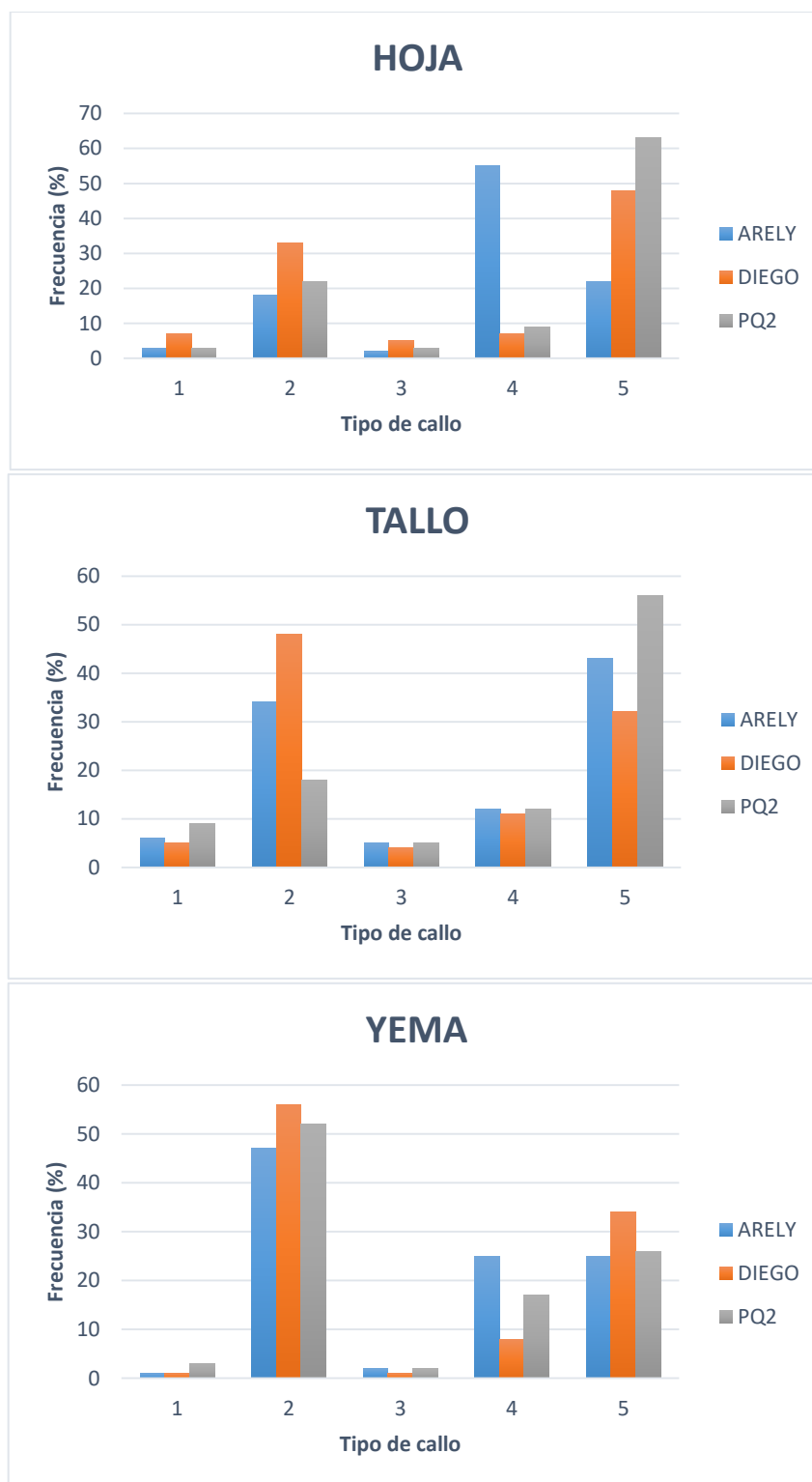


Figura 11 Gráficos de frecuencia para la variable textura, el regulador del crecimiento es TDZ los tipos de callo son 1 = Suave acuoso; 2 =Friable, 3 = Envuelto en mucílago; 4 =Semicompacto; 5 = Compacto duro.

Anexo 3

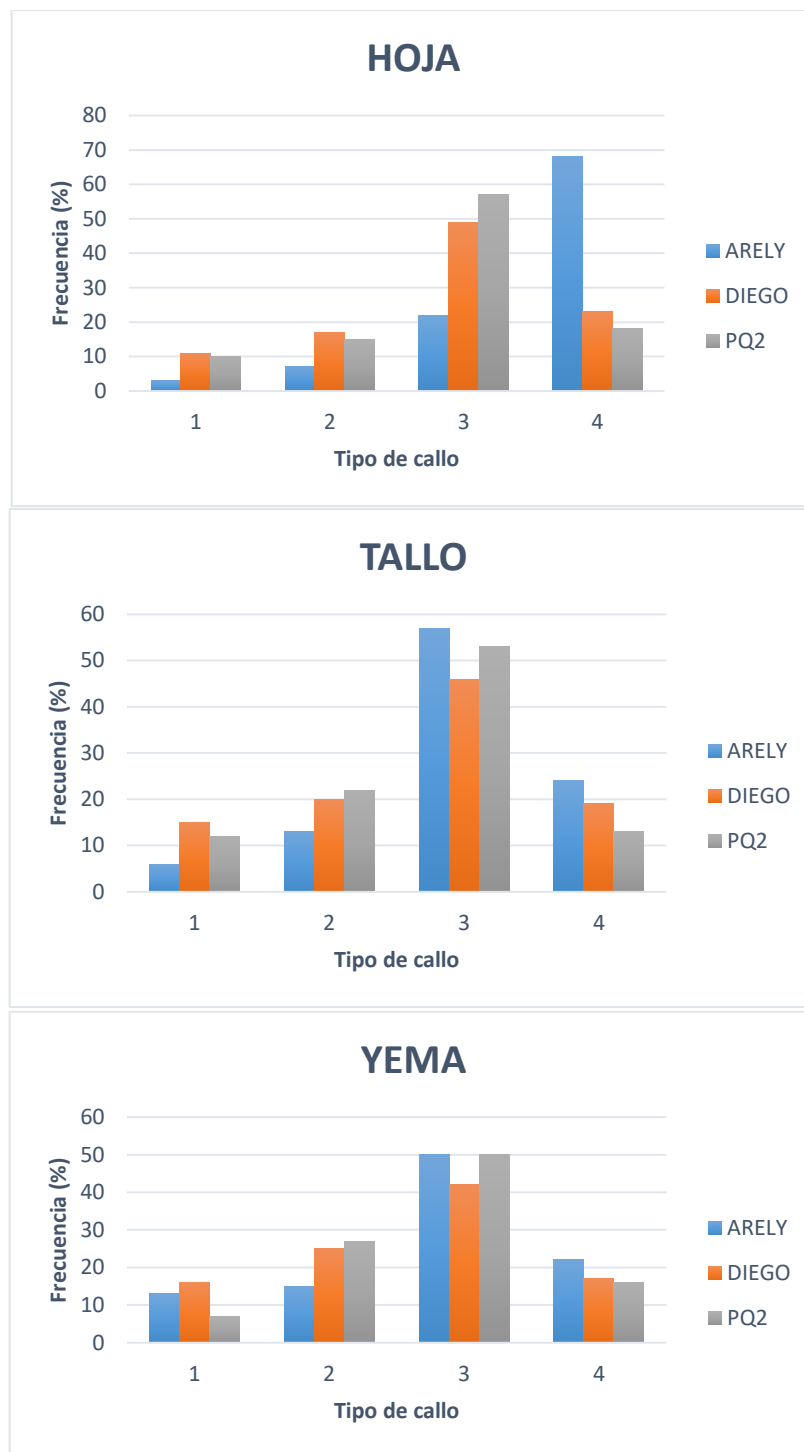


Figura 12 Gráficos de frecuencia para la variable color, el regulador del crecimiento es TDZ los tipos de callo son 1 = Amarillo; 2 = Cremoso traslúcido, 3 = Amarillo cafésoso; 4 = Verde clorofílico.

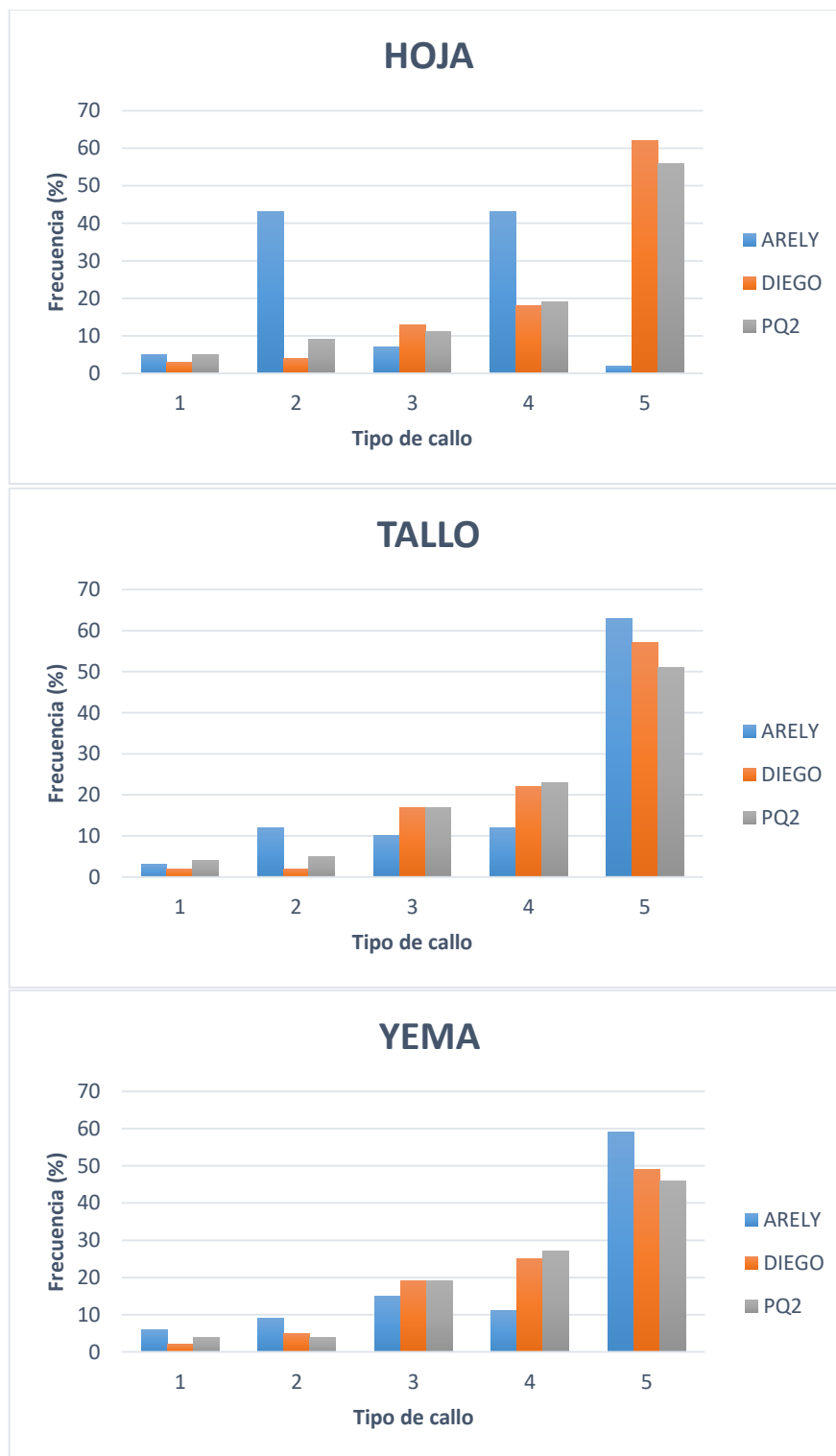


Figura 13 Gráficos de frecuencia para la variable textura, el regulador del crecimiento es TDZ los tipos de callo son 1 = Suave acuoso; 2 =Friable, 3 = Envuelto en mucílago; 4 =Semicompacto; 5 = Compacto duro.

Anexo 4

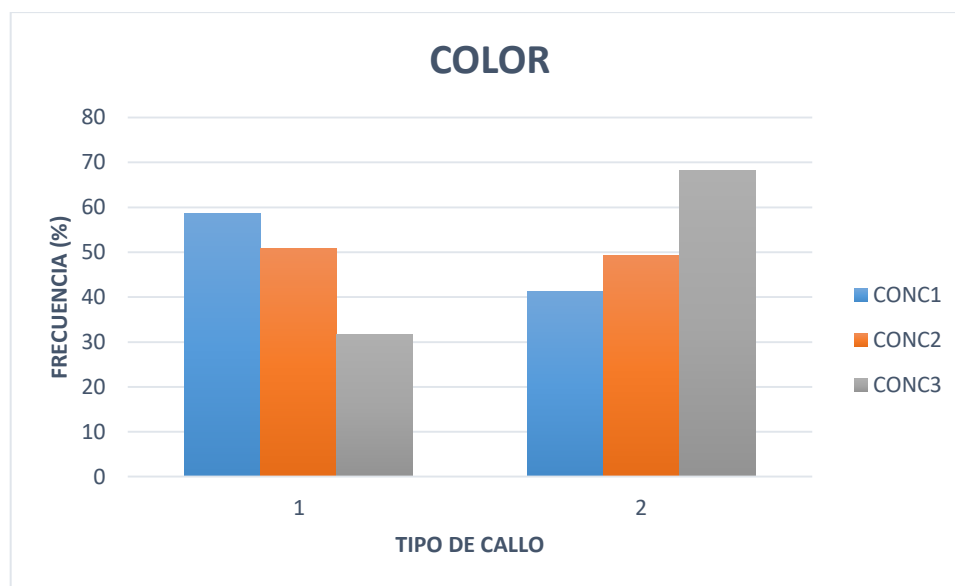


Figura 14 Gráfico de frecuencia para la variable color, diferentes concentraciones de fuente de carbono los tipos de callo son 1 = Amarillo; 2 =Cremoso traslúcido, 3 = Amarillo cafésoso; 4 =Verde clorofílico; CONC1= 40 mg L⁻¹ maltosa y 10 mg L⁻¹ glucosa; CONC2=30 mg L⁻¹ maltosa y 7.5 mg L⁻¹ glucosa; CONC3=20 mg L⁻¹ maltosa y 5 mg L⁻¹ glucosa

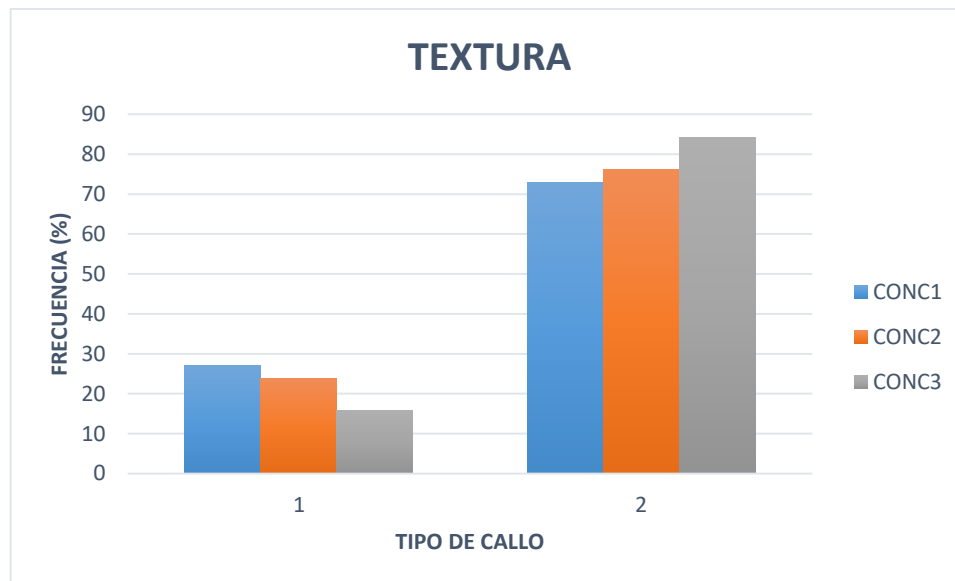


Figura 15 Gráfico de frecuencia para la variable textura, diferentes concentraciones de fuente de carbono los tipos de callo son 1 = Suave acuoso; 2 =Friable, 3 = Envuelto en mucílago; 4 =Semicompacto; 5 = Compacto duro; CONC1= 40 mg L⁻¹ maltosa y 10 mg L⁻¹ glucosa; CONC2=30 mg L⁻¹ maltosa y 7.5 mg L⁻¹ glucosa; CONC3=20 mg L⁻¹ maltosa y 5 mg L⁻¹ glucosa

Anexo 5

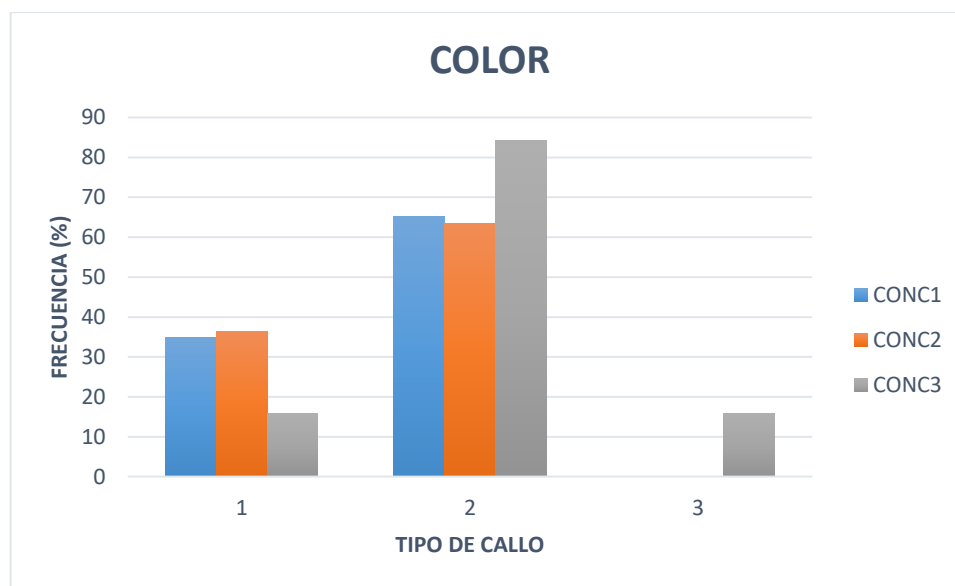


Figura 16 Gráfico de frecuencia para la variable color, diferentes concentraciones de fuente de carbono los tipos de callo son 1 = Amarillo; 2 =Cremoso traslúcido; 3 = Amarillo cafésoso; 4 =Verde clorofílico; CONC1= 40 mg L⁻¹ maltosa y 10 mg L⁻¹ glucosa; CONC2=30 mg L⁻¹ maltosa y 7.5 mg L⁻¹ glucosa; CONC3=20 mg L⁻¹ maltosa y 5 mg L⁻¹ glucosa

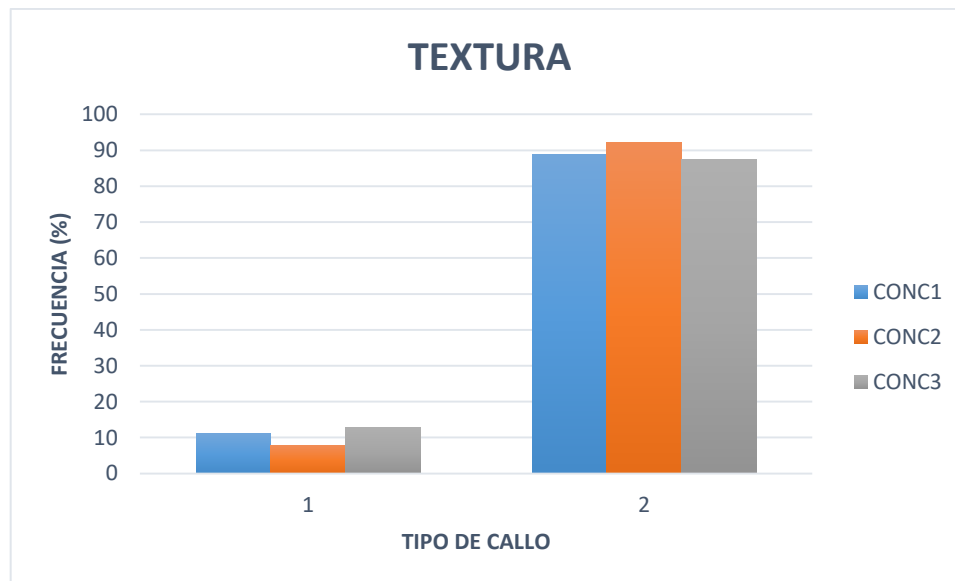


Figura 17 Gráfico de frecuencia para la variable textura, diferentes concentraciones de fuente de carbono los tipos de callo son 1 = Suave acuoso; 2 =Friable, 3 = Envuelto en mucílago; 4 =Semicompacto; 5 = Compacto duro; CONC1= 40 mg L⁻¹ maltosa y 10 mg L⁻¹ glucosa; CONC2=30 mg L⁻¹ maltosa y 7.5 mg L⁻¹ glucosa; CONC3=20 mg L⁻¹ maltosa y 5 mg L⁻¹ glucosa

Anexo 6

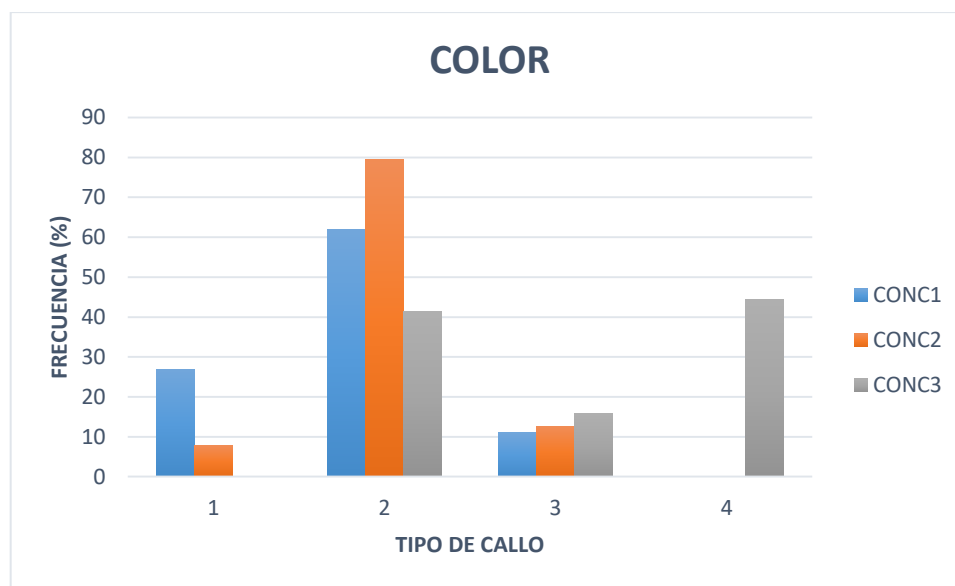


Figura 18 Gráfico de frecuencia para la variable color, diferentes concentraciones de fuente de carbono los tipos de callo son 1 = Amarillo; 2 =Cremoso traslúcido, 3 = Amarillo cafésoso; 4 =Verde clorofílico; CONC1= 40 mg L⁻¹ maltosa y 10 mg L⁻¹ glucosa; CONC2=30 mg L⁻¹ maltosa y 7.5 mg L⁻¹ glucosa; CONC3=20 mg L⁻¹ maltosa y 5 mg L⁻¹ glucosa

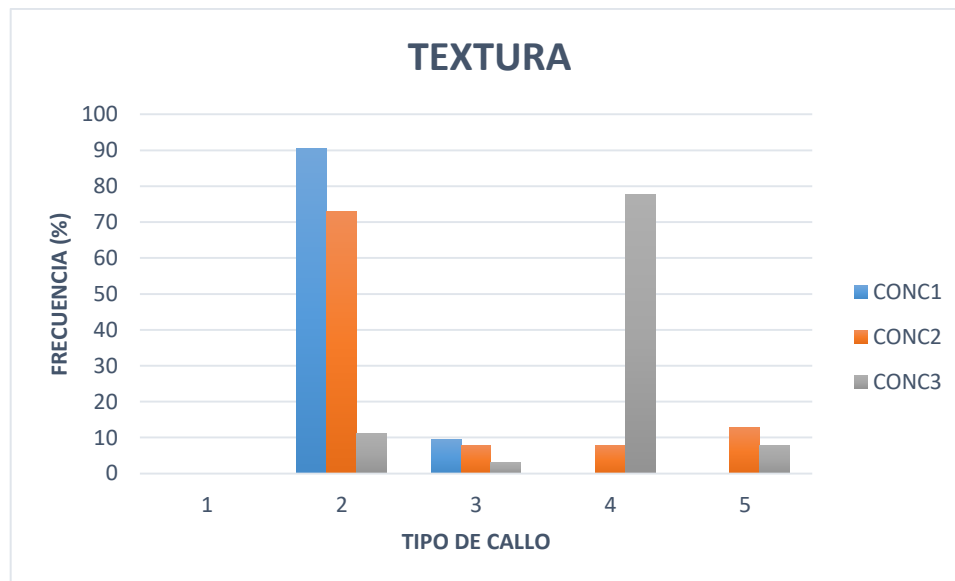


Figura 19 Gráfico de frecuencia para la variable textura, diferentes concentraciones de fuente de carbono los tipos de callo son 1 = Suave acuoso; 2 =Friable, 3 = Envuelto en mucílago; 4 =Semicompacto; 5 = Compacto duro; CONC1= 40 mg L⁻¹ maltosa y 10 mg L⁻¹ glucosa; CONC2=30 mg L⁻¹ maltosa y 7.5 mg L⁻¹ glucosa; CONC3=20 mg L⁻¹ maltosa y 5 mg L⁻¹ glucosa