



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO FORESTAL

MADURACIÓN Y GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE LINALOE *In vitro y Ex vitro*

MARÍA MÓNICA GONZÁLEZ OROZCO

TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS


MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

La presente tesis, titulada: **Maduración y germinación de embriones somáticos de linaloe *in vitro* y *ex vitro***, realizada por la alumna: **María Mónica González Orozco**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
FORESTALES
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:


DR. GREGORIO ARELLANO OSTOA

ASESOR:


DR. VÍCTOR MANUEL CETINA ALCALÁ

ASESOR:


DRA. MA. DE LOURDES ARÉVALO GALARZA

ASESOR:


DR. ARNULFO ALDRETE

Montecillo, Texcoco, México, enero de 2014

MADURACIÓN Y GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE LINALOE

In vitro y Ex vitro

María Mónica González Orozco, Mc.

Colegio de Postgraduados, 2014

El linaloe [*Bursera linanoe* (La Llave) Rzed., Calderón & Medina] es una especie endémica de México con una importancia histórica, cultural y económica. Sin embargo, ha sido expuesta a la sobreexplotación, lo que ha causado una notable disminución en las poblaciones naturales. Por lo que en la presente investigación se evaluó la embriogénesis somática como una vía de propagación mediante el cultivo *in vitro*. Con el objetivo de mantener la capacidad embriogénica y cuantificar la tasa de multiplicación de tres líneas embriogénicas de linaloe, se evaluó el efecto de diferentes reguladores de crecimiento, fuentes de carbono y otros componentes, durante la maduración y germinación de embriones somáticos, además de evaluar la aclimatación en invernadero. Los resultados muestran que la adición de 1 g L⁻¹ de carbón activo ayuda a mejorar la calidad y la multiplicación de las líneas embriogénicas. La mejor concentración de maltosa para maduración fue del 4 % p/v. Los niveles evaluados con ácido abscísico (ABA) y polietilenglicol no favorecieron la maduración, sin embargo se observó un posible efecto de ABA en la embriogénesis secundaria lo cual revela que puede ser un regulador a probar en la multiplicación. La adición de 0.002 mg L⁻¹ de brasinoesteroide favoreció el desarrollo de raíces y ayudó a reducir la embriogénesis secundaria y callo. Durante la aclimatación, la supervivencia de las plantas después de cinco meses en invernadero fue del 66 %.

Palabras clave: *Bursera linanoe*, embriogénesis secundaria, fuente de carbono, brasinoesteroide, polietilenglicol, ácido abscísico, ácido giberélico.

ABSTRACT

Linaloe is an endemic species of Mexico with historical, cultural, and economic importance. However, it has been exposed to overexploitation, which has caused an important decrease in its natural populations. Therefore, the present research opted for somatic embryogenesis as a means of propagation through *in vitro* cultivation. In order to maintain the embryogenic capacity and quantify the multiplication ratio of three linaloe embryogenic lines, the effects of different growth regulators, carbon sources, and other components were evaluated during the maturation and germination of somatic embryos, besides evaluating the acclimatizing in greenhouse. The results show that adding 1 g L⁻¹ activated charcoal helps in the quality and multiplication of the embryogenic lines. Using maltose, the best concentration for maturation was 4% w/v. The levels evaluated with abscisic acid (ABA) and polyethylene-glycol did not favor maturation. However, a possible effect of ABA on the secondary embryogenesis which reveals to be a regulator to test in the multiplication was observed. Adding 0.002 mg L⁻¹ brassinosteroid favored root development and helped decrease secondary embryogenesis and callosities. During acclimatizing, plant survival after five months in the greenhouse was 66%.

Key words: *Bursera linanoe*, secondary embryogenesis, carbon sources, brassinosteroid, polyethylene-glycol, abscisic acid, gibberellic acid.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar doy gracias a Dios, por permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A los millones de mexicanos (as) que pagan impuestos, quienes, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación.

Al Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión No. 167304, con el proyecto “Producción de linalol durante la inducción, diferenciación y maduración de embriones somáticos de linaloe en biorreactores de inmersión temporal”.

Al Dr. Gregorio Arellano por su dirección y toda la ayuda brindada durante la realización de este trabajo, gracias Dr. por el apoyo para la realización de la estancia a España.

A la Dra. Lourdes, Dr. Víctor y Dr. Arnulfo (integrantes de mí Consejo Particular) por el tiempo y el apoyo brindado, pero sobre todo por la paciencia hacia mí.

A mis padres Gabriela y Javier por motivarme y darme todo su apoyo, a ustedes por siempre mi agradecimiento.

A Isaac por todo su apoyo, por siempre estar a mi lado en el cumplimiento de esta meta que tenemos juntos, por estar conmigo en los buenos y malos momentos. De igual manera agradezco a sus papás que nos han apoyado incondicionalmente.

Al señor Guillermo Arellano por la asesoría y la ayuda brindada en laboratorio.

A mis amigos, quienes fueron un apoyo emocional durante todo este tiempo.

Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y amor a mis padres Gabriela y Javier que hicieron todo para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme todo su apoyo. A mi familia en general, porque me han brindado su apoyo incondicional.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1. Objetivo general.....	2
2.2. Objetivos particulares.....	2
3. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1 Embriogénesis somática.....	4
3.1.1 Antecedentes de la embriogénesis somática	5
3.1.2 Relaciones hormonales en las etapas del proceso de la embriogénesis somática.....	6
3.1.3 Desarrollo del embrión somático	9
3.1.4 Mantenimiento de la capacidad embriogénica	10
3.1.5 Embriogénesis secundaria	12
3.1.6 Maduración de los embriones somáticos	14
3.1.7 Germinación y conversión a plántula	17
3.1.8 Aclimatación de plantas cultivadas <i>in vitro</i>	20
3.2 El linaloe	22
3.2.1 Descripción y distribución de la especie	22
3.2.2 Importancia de la especie	24
3.2.3 Propagación de linaloe	25
3.2.4 Características de la madera y existencias reales de linaloe.....	27
3.2.5 Usos de linaloe	28
4. MATERIALES y MÉTODOS	30
4.1 Localización del experimento	30
4.2 Material vegetal.....	30
4.3 Proliferación y mantenimiento del callo embriogénico	31
4.3.1 Efecto del carbón activo adicionado al medio de multiplicación de tres líneas embriogénicas	31
4.3.2 Producción de etileno en las líneas embriogénicas LEL 61-4, LEL PUE-6 y LEL B-3	32
4.4 Maduración de embriones somáticos.....	34
4.4.1 Efecto de la sacarosa en la maduración de embriones somáticos.....	34
4.4.2 Efecto de la maltosa en la maduración de embriones somáticos	35
4.4.3 Efecto del ácido abscísico y polietilenglicol en la maduración de embriones somáticos	36
4.5 Germinación de embriones somáticos.....	37
4.5.1 Efecto de brasinoesteroides sobre la germinación de embriones somáticos	37
4.5.2 Efecto del ácido giberélico sobre la germinación de embriones	

somáticos.....	39
4.6 Aclimatación de plántulas provenientes de embriones somáticos en invernadero	40
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1 Proliferación y mantenimiento del callo embriogénico	43
5.1.1 Efecto del carbón activo adicionado al medio de multiplicación de tres líneas embriogénicas	43
5.1.2 Producción de etileno en las líneas embriogénicas LEL 61-4, LEL PUE-6 y LEL B-3	54
5.2 Maduración de embriones somáticos.....	58
5.2.1 Efecto de la sacarosa en la maduración de embriones somáticos.....	59
5.2.2 Efecto de la maltosa en la maduración de embriones somáticos	69
5.2.3 Efecto del ácido abscísico y polietilenglicol en la maduración de embriones somáticos	78
5.3 Germinación de embriones somáticos.....	89
5.3.1 Efecto de brasinoesteroides sobre la germinación de embriones somáticos	89
5.3.2 Efecto del ácido giberélico y maltosa en la germinación de embriones somáticos.....	97
5.4 Aclimatación de plántulas provenientes de embriones somáticos en invernadero.....	103
5.4.1 Comportamiento e identificación de estomas.....	114
6. CONCLUSIONES	120
7. LITERATURA CITADA	122

LISTA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1.	Efecto de la adición del carbón activo en los medios de cultivo sobre la multiplicación de tres líneas embriogénicas de linaloe, datos obtenidos a las 4 semanas de cultivo.....	49
Cuadro 2.	Efecto de la adición del carbón activo en los medios de cultivo sobre la coloración de los embriones somáticos de tres líneas embriogénicas de linaloe durante su multiplicación datos obtenidos a las 4 semanas de cultivo	50
Cuadro 3.	Efecto de la sacarosa en el desarrollo y maduración de embriones somáticos de tres líneas embriogénicas de linaloe a los 30 días de cultivo.....	67
Cuadro 4.	Efecto de la sacarosa en el desarrollo de embriones somáticos de tres líneas embriogénicas de linaloe a los 30 días de cultivo.....	68
Cuadro 5.	Efecto de la maltosa en el desarrollo y maduración de embriones somáticos de dos líneas embriogénicas de linaloe a los 30 días de cultivo.....	76
Cuadro 6.	Efecto de la maltosa en el desarrollo de embriones somáticos de dos líneas embriogénicas de linaloe a los 30 días de cultivo.....	77
Cuadro 7.	Efecto del ABA y PEG en el desarrollo y maduración de embriones somáticos de la línea embriogénica LEL 61-4 de linaloe a los 30 días de cultivo.....	81
Cuadro 8.	Efecto del ABA y PEG en el desarrollo de embriones somáticos de la LEL 61-4 de linaloe a los 30 días de cultivo.....	82
Cuadro 9.	Efecto del BR en la germinación de embriones somáticos de la LEL 61-4 de linaloe a los 30 días de cultivo.....	93
Cuadro 10	Efecto del BR en combinación con dos fuentes de carbono en la germinación de embriones somáticos de la LEL PUE-6 a los 30 días de cultivo.....	96
Cuadro 11.	Efecto del AG ₃ en la germinación de embriones somáticos de la LEL PUE-6. Datos tomados a los 30 días de cultivo.....	100

Cuadro 12.	Efecto del tipo de sustrato en el incremento de altura en plantas provenientes de embriones somáticos de linaloe después de seis meses en aclimatación.	106
Cuadro 13.	Efecto de dos tipos de sustrato en el desarrollo de plantas provenientes de embriones somáticos después de seis meses de aclimatación.....	107
Cuadro 14.	Efecto del tipo de sustrato en el desarrollo de la raíz en plantas provenientes de embriones somáticos de linaloe a los seis meses fuera de la condición <i>in vitro</i>	108

LISTA DE FIGURAS

	Página	
Figura 1.	Embrión somático en etapa cotiledonar del clon LEL 61-4 con embriones somáticos secundarios en distintos estadios de desarrollo en la radícula e hipocótilo. Dichos embriones están fusionados entre sí y son difíciles de separar.	44
Figura 2.	Proliferación de los cultivos embriogénicos en placas Petri (cada grupo consiste en un explante).....	44
Figura 3.	Embriones somáticos en el medio de multiplicación M50 con y sin carbón activo a) Masas embriogénicas (LEL PUE-6) en el medio M50 con carbón activo. b) Masas embriogénicas (LEL PUE-6) en el medio M50 sin carbón activo.....	45
Figura 4.	Proliferación de las masas embriogénicas en el medio MSM. a) y b) Línea embriogénica LEL 61-4. c) y d) Línea embriogénica LEL PUE-6. e) y f) Línea embriogénica LEL B-3. Observándose menos embriones y mayor necrosis en esta última línea embriogénica.....	47
Figura 5.	Embriones con deformaciones en los medios de multiplicación a) Embrión deforme con la radícula. b) Grupo de embriones fusionados en etapa torpedo. c) Embrión con cotiledones prominentes ondulados. d) Embrión con un solo cotiledón.....	48
Figura 6.	Masas embriogénicas durante seis semanas de cultivo. a) Toma de las muestras. b) LEL B-3. c) LEL 61-4. d) LEL PUE-6.....	56

Figura 7.	Concentración de etileno ($\mu\text{L/g}$ de tejido) en el espacio de cabeza de recipientes con medio de cultivo y tres líneas embriogénicas.....	57
Figura 8.	Concentración de CO_2 (mL/g de tejido) en el espacio de cabeza de recipientes con medios de cultivo y tres líneas embriogénicas.....	57
Figura 9.	Embriones somáticos de aproximadamente 5 mm de longitud antes de los tratamientos de maduración.....	58
Figura 10.	Embriones somáticos tratados con sacarosa 3 %. a) Embrión con crecimiento de raíces sin desarrollo de ápice de LEL 61-4. b). LEL PUE-6 c) Embrión con embriones secundarios. d) Embrión con necrosis de LEL B-3 e) Embrión con cotiledones pequeños. f) Embrión con callo.....	61
Figura 11.	Embriones somáticos tratados con sacarosa 4% de dos líneas embriogénicas. a) y b) embrión donde se aprecia el crecimiento de dos embriones secundarios en la LEL 61-4. c) embrión deforme de LEL B-3 y d) embrión con crecimiento de callo amorfo de LEL B-3.....	62
Figura 12.	Embriones somáticos tratados con sacarosa 4% de la LEL PUE-6. a) y b) embriones poco desarrollados c) y d) embrión somático donde se observa el desarrollo del primer par de folíolos y emergencia de la raíz. e) embrión somático que desarrollo hojas.....	63
Figura 13.	Embriones tratados con sacarosa 6 % poco desarrollados con apariencia clorótica de las tres líneas embriogénicas. a) y b) LEL 61-4. c) y d) LEL PUE-6). e) y f) LEL B3.....	65
Figura 14.	Embriones tratados con sacarosa 8 % poco desarrollados con apariencia clorótica de las tres líneas. a) y b) LEL 61-4. c) y d) LEL PUE-6. e) y f) LEL B-3.	66
Figura 15.	Embriones tratados con 3 y 4 % de maltosa de la LEL 61-4. a) y b) embriones somáticos tratados con maltosa 3 %. c), d), e) y f) embriones somáticos tratados con maltosa 4 % en la imagen c y e) embriones con desarrollo de hojas.....	71
Figura 16.	Embriones somáticos tratados con 6 y 8 % de maltosa de la LEL 61-4. a) y b) Embriones somáticos tratados con maltosa 6 %. c) y d) Embriones somáticos tratados con maltosa 8 %.....	72
Figura 17.	Embriones somáticos tratados con maltosa 3 y 4 % de la LEL	

	PUE-6. a) y b) Embriones somáticos tratados con maltosa 3 % de la LEL PUE-6. c) y d) Embriones somáticos tratados con maltosa 4 % LEL PUE-6.....	73
Figura 18.	Embriones somáticos tratados con maltosa 6 y 8 % de la LEL PUE-6. a) y b) Embriones somáticos tratados con maltosa 6 % de la LEL PUE-6. c) y d) Embriones somáticos tratados con maltosa 8 % LEL PUE-6.....	74
Figura 19.	Embriones con problema de desarrollo de apice (formación de una protuberancia con apariencia de posible brotación de hojas). a) Embrión tratado con maltosa 4 % de la LEL PUE-6, b) embrión tratado con Maltosa 6 % de la LEL PUE-6, c) embrión tratado con maltosa 6 % de la LEL 61-4.....	75
Figura 20.	Embriones somáticos tratados con ABA. a) y b) embriones somáticos tratados con 3 μ M de ABA de la LEL 61-4. c) y d) embriones somáticos tratados con 7 μ M de ABA LEL 61-4.....	79
Figura 21.	Embriones somáticos tratados con PEG. a) y b) embriones somáticos tratados con PEG 5 % de la LEL 61-4. c) y d) embriones somáticos tratados con PEG 6 % LEL 61-4.....	80
Figura 22.	Embriones somáticos de aproximadamente 10 mm de longitud antes de los tratamientos de germinación.....	89
Figura 23.	Embriones somáticos tratados con BR de la línea LEL 61-4. a) y b) Embriones sin la aplicación del regulador (Testigo). c) y d) Embriones con BR 0.002.....	91
Figura 24.	Embriones somáticos tratados con 0.02 y 0.2 BR de la línea LEL 61-4. a) y b) embriones con 0.02 de BR, c) y d) embriones con 0.2 de BR. e) Embrión con el domo apical plano	92
Figura 25.	Embriones somáticos tratados con sacarosa 4 % + BR 0.002 de la línea LEL PUE-6.....	95
Figura 26.	Embriones somáticos tratados con maltosa 4 % + BR 0.002 de la LEL PUE-6 con deformación en la parte del ápice.....	95
Figura 27.	Embriones somáticos tratados con AG ₃ (0.001) de la línea LEL PUE-6. a) y b) embriones sin la aplicación del regulador (Testigo), c) y d) embriones con AG ₃ (0.001 mg L ⁻¹).....	98
Figura 28	Embriones somáticos tratados con AG ₃ (0.01 y 0.1) de la línea LEL PUE-6. a) y b) embriones con AG ₃ (0.01 mg L ⁻¹) c) y d)	

	embriones con AG ₃ (0.1 mg L ⁻¹).....	99
Figura 29.	Hojas de plantas de linaloe provenientes de embriones somáticos después de cinco meses en condiciones de invernadero.....	104
Figura 30.	Sistema radical de las plantas provenientes de embriones somáticos después de 5 meses en invernadero. a) Plantas establecidas en la mezcla de tezontle, corteza de pino y peat moss (30:30:40, v/v/v) y b) plantas establecidas en el sustrato de aserrín compostado y agrolita (60:40, v/v).....	109
Figura 31.	Planta proveniente de semilla de un año de edad.....	110
Figura 32.	Estomas de <i>Bursera linanoe</i> . a) y b) Estomas en hoja de tres foliolos de planta proveniente de estaca mantenida en invernadero utilizada como planta modelo. c) y d) Estomas en hoja de tres foliolos de plántula provenientes de embriones somáticos adaptada durante seis meses en invernadero. e) y f) Estomas en hoja de tres foliolos de plántula <i>in vitro</i> provenientes de embriones somáticos.....	117
Figura 33.	Tipo de tricomas de <i>Bursera linanoe</i> . a) pelos tectores unicelulares. b) Tricoma glandular multicelular.....	118
Figura 34.	Planta de linaloe proveniente de embrión somático después de 18 meses en invernadero.....	119

1. INTRODUCCIÓN

Bursera es un género que incluye más de cien especies, distribuidos desde el Norte de América hasta el Perú y el sur de Brasil, albergando la mayor diversidad en México donde se conocen más de 80 especies (Rzedowski y Kruse, 1979). Dentro de este género se encuentra el linaloe [*Bursera linanoe* (La Llave) Rzed., Calderón & Medina], especie caducifolia, que en México es de importancia histórica, cultural y económica, tiene usos artesanales, industriales y medicinales, gracias a la obtención de su aceite esencial (linalol), el veteado de la madera y su característico aroma. Debido a estas cualidades, la especie ha sido expuesta a la sobreexplotación, además de que presenta baja tasa de regeneración natural (Andrés-Hernández y Espinosa-Organista, 2002).

La embriogénesis somática es una forma de propagación vegetativa mediante el cultivo *in vitro* de tejidos, que se refiere al proceso en el que las células somáticas son inducidas para formar embriones bipolares (somáticos), a través de un serie de pasos de desarrollo similares a las de los embriones cigóticos (Stasolla *et al.*, 2002). Son estructuralmente comparables a los embriones cigóticos y pasan a través de las mismas etapas de desarrollo (globular, corazón, torpedo y cotiledonar) y dan lugar a ejes con un ápice de la raíz en un polo y un ápice vegetativo en el otro (Ammirato, 1977). Finalizado el desarrollo del embrión somático tendrá que pasar por una fase de maduración, para lograr que el embrión sea capaz de convertirse en una plántula (con la formación de epicótilo y raíz) (Stasolla *et al.*, 2002) y posteriormente la sobrevivencia en el suelo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Generales:

Determinar las condiciones óptimas del medio de cultivo necesarias para mantener la capacidad embriogénica y cuantificar la tasa de multiplicación de tres líneas embriogénicas de linaloe, establecidas a partir de cotiledones y hojas jóvenes. Así como evaluar el efecto de diferentes reguladores del crecimiento, fuentes de carbono y otros componentes durante la maduración y germinación *in vitro*. Además de evaluar el proceso de aclimatación de las plántulas en invernadero.

2.2 Objetivos particulares:

- Analizar el efecto del carbón activo en los medios de multiplicación de embriones somáticos de tres líneas embriogénicas (LEL 61-4, LEL PUE-6 y LEL B-3).
- Cuantificar la producción de etileno y CO₂ durante la multiplicación de embriones secundarios en las líneas embriogénicas LEL 61-4, LEL PUE-6 y LEL B-3.
- Evaluar el efecto de la fuente de carbono, ácido abscísico (ABA) y el polietilenglicol (PEG) sobre la maduración de los embriones somáticos de linaloe.
- Analizar el efecto del ácido giberélico (AG₃) y brasinoesteroides (BR) en la germinación *in vitro* y conversión a plántulas de linaloe.

- Evaluar el efecto de dos mezclas de sustratos en la supervivencia y desarrollo durante el proceso de aclimatación de las plántulas de linaloe provenientes de embriones somáticos germinados *in vitro*.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Embriogénesis Somática

La embriogénesis somática se refiere al proceso en el que las células somáticas son inducidas para formar embriones bipolares, a través de un serie de pasos de desarrollo similares a las de los embriones cigóticos (Stasolla *et al.*, 2002). Estos adquieren la bipolaridad de forma temprana, con un polo caulinar y otro radical (Schumann *et al.*, 1995). Una de las diferencias en cuanto al embrión cigótico, es que no hay conexión vascular con en el tejido del que se originan (Ammirato, 1983).

Este método presenta ventajas en comparación con las otras vías de regeneración vegetal (yemas axilares y organogénesis) como por ejemplo: se descartan las etapas de enraizamiento y elongación de brotes, dado que el embrión somático es un propágulo completo. Es un sistema de regeneración para la propagación masiva de genotipos, así mismo permite la aplicación de las técnicas de crioconservación, transformación genética y cultivo en biorreactores (Celestino *et al.*, 2005; Merkle *et al.*, 1995). Sin embargo la embriogénesis somática también presenta una serie de inconvenientes, el más importante es la frecuencia de anormalidades morfológicas (número, tamaño y forma de cotiledones) y fisiológicas (maduración incorrecta y germinación precoz) (Yeung, 1995).

Se distinguen dos tipos de embriogénesis somática: **directa** e **indirecta** (Ammirato, 1987). En la directa el embrión se desarrolla directamente del tejido del explanto original y es característica de explantos en las que todas o algunas de

sus células están predeterminadas como embriogénicas, como consecuencia de que todavía retienen algunas propiedades de las células embrionarias originales (Yeung, 1995). Mientras que en la indirecta las células del explanto pasan por una serie de divisiones que producen la formación de callo, en la que las células se desdiferencian, adquieren cierto grado de competencia y luego se determinan hasta su expresión, es decir aparecen las primeras estructuras preembriogénicas que posteriormente iniciarán el desarrollo de los embriones somáticos (von Arnold *et al.*, 2002).

3.1.1 Antecedentes de la embriogénesis somática

La historia de la embriogénesis se remonta desde 1902, donde Haberlandt anunció que si las células de un organismo tenían la misma información genética que la célula inicial, sería posible revertir su expresión génica para que volvieran a expresar el patrón de desarrollo embriogénico y formar embriones de origen somático, es de aquí de donde proviene la definición del término totipotencia que es la capacidad de las células vegetales para formar una planta completa. Lo que indica que todos los genes necesarios para formar una planta, están contenidos en una célula somática. Estos genes están inactivos en las células diferenciadas pero pueden expresarse cuando esas células se cultivan en condiciones adecuadas en virtud a esa totipotencia (Krikorian y Berquam, 1966).

Las primeras descripciones de la obtención de embriogénesis somática fueron publicadas en zanahoria donde se obtuvieron plántulas provenientes de callos por Steward *et al.* (1958) y Reinert (1959). A partir de entonces se han ido

desarrollando protocolos para esta vía de regeneración en numerosas especies tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas.

En especies forestales las primeras especies leñosas en las que se consiguió la inducción de embriones somáticos fue en *Santalum album* (Rao, 1965), en *Picea abies* a partir de embriones cigóticos (Chalupa, 1985; Hakman *et al.*, 1985). En el mismo año, en *Pinus radiata* también en embriones cigóticos (Smith *et al.*, 1985) y en *Larix decidua* a partir del megagametófito (Nagmani y Bonga, 1985). Después del primer trabajo de embriogénesis somática en *P. radiata*, el número de especies en las que se ha logrado inducir la embriogénesis somática, ha ido en aumento, al grado que ya se están produciendo miles de brozales clonales para plantaciones en algunas especies como *Picea abies*, *Picea glauca*, *Picea mariana*, *Picea sitchensis*, *Pinus elliotii*, *Pinus pinaster*, *Pinus radiata*, *Pinus strobus*, *Pinus sylvestris*, *Pinus taeda* y *Pseudotsuga menziesii* (Celestino *et al.*, 2005; Klimaszewska *et al.*, 2007).

En lo que respecta al género *Bursera* se han inducido embriones somáticos en *Commiphora wightii* a partir de embriones cigóticos (Kumar *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2006) y más recientemente en *Bursera linanoe* inducidos en cotiledones y hojas en expansión (Arellano-Ostoa *et al.*, 2009).

3.1.2 Relaciones hormonales en las etapas del proceso de la embriogénesis somática

El proceso de la embriogénesis somática comienza con la etapa de inducción, que consiste en proporcionar a las células del explanto las condiciones necesarias para que se sustituya el patrón de expresión génica actual por un

patrón embriogénico (Merckle *et al.*, 1995). Estas células dependen entonces de diferentes factores como: el genotipo, el tipo de planta donante, la edad o etapa de desarrollo del explante, el ambiente externo que incluye la composición de los medios y las condiciones físicas de cultivo (luz y temperatura) (Malgorzata, 2004). Así como el tipo de explante: hojas, peciolo, raíces, semillas, cotiledones, meristemos y embriones cigóticos (Malgorzata, 2004; Arellano-Ostoa *et al.*, 2009).

Por lo general la inducción se da ante la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, principalmente hormonas como las auxinas, esenciales para iniciar la simetría bilateral durante la embriogénesis somática tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas (Liu *et al.*, 1993).

La presencia de auxinas en el medio de cultivo, con o sin citocininas, puede inducir no solo la formación de embriones somáticos sino también de callo y de órganos (raíces o brotes) (Dudits *et al.*, 1991). La auxina más utilizada es el ácido 2,4-dichlorofenoxiacético (2,4-D), generalmente en concentraciones de 1 a 10 μM (von Arnold, 2008), aunque también se ha utilizado en altas concentraciones como 452 μM en *Cocos nucifera* (Gupta *et al.*, 1984). La adición de auxinas en altas concentraciones, aumenta los niveles endógenos de estas hormonas en los explantes (Pasternak *et al.*, 2002). Dichos niveles provocan un cambio en la morfología celular, que será reflejado en la reorganización de los componentes estructurales de las células, lo cual las determinara como células embriogénicas (Dudits *et al.*, 1991). El ácido naftalénacético (ANA), es otra auxina usada para inducir embriogénesis somática y en menor uso algunas otras como AIA (ácido indolacético), Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) y Dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico) (Raemakers *et al.*, 1995). Otro tipo de hormona que

se utilizan para la inducción son las citocininas utilizadas en concentraciones de 0.1 a 1 μ M (von Arnold, 2008).

El azúcar es otro componente importante, que se incluye en todos los medios de cultivo de tejido, como una fuente de energía y que proporciona las condiciones osmóticas para el crecimiento celular *in vitro*, siendo la sacarosa la más utilizada para la embriogénesis somática (Malgorzata, 2004).

Se ha reconocido ampliamente que las células somáticas pueden adquirir un potencial embriogénico, como resultado de diferentes estímulos externos físicos y químicos llamados factores de estrés (Malgorzata, 2004), como la presión osmótica, el pH (posible marcador de desdiferenciación celular y activación celular) (Pasternak *et al.*, 2002), temperatura alta o baja y alta concentración de auxinas (Kiyosue *et al.*, 1993). La luz es una señal importante en la mayoría de los cultivos de inducción de embriogénesis somática, y esta fase se lleva a cabo en condiciones de oscuridad porque la luz es un factor de diferenciación que se opone a la formación de células juveniles (Malgorzata, 2004).

Después de la inducción sigue la etapa de expresión que se refiere a la evolución de las masas proembriogénicas, para dar inicio a la formación de los embriones somáticos (Jiménez, 2005). El crecimiento continuo en un medio que contiene 2,4-D en concentraciones como las utilizadas para la inducción, no permite la reducción en los niveles endógenos de las auxinas (Pasternak *et al.*, 2002), motivo por el cual es necesario un medio de cultivo libre de estas hormonas que promuevan dicha etapa (Jiménez, 2005).

La expresión se puede dividir en dos subetapas, la primera transcurrido desde el momento de la aplicación del estímulo para inducir la progresión en el

desarrollo del embrión (la eliminación de 2,4-D en el medio de cultivo), hasta el momento en el que los primeros cambios son visibles (aparición de proembriones y embriones en etapa globular (Jiménez, 2005). En la segunda fase los embriones pasan a través de las etapas típicas de desarrollo, es decir, globular, corazón, torpedo y cotiledonar.

En todos los procesos del desarrollo de las plantas, la expresión de la embriogénesis somática podría ser provocada por diferentes factores, dependiendo de la especie, variedad y condiciones fisiológicas de la planta donante (Dudits *et al.*, 1995). Trewavas (1981) planteó que solo algunos tejidos tienen un cierto grado de sensibilidad reaccionando a ciertas concentraciones de hormonas en los cultivos. Sin embargo como ya se ha mencionado, en la mayoría de los casos la reducción o eliminación de auxinas en los medios de cultivo, es lo que ha promovido la aparición y desarrollo de los embriones somáticos (Jiménez, 2005).

3.1.3 Desarrollo del embrión somático

Después de una intensa actividad mitótica durante la etapa de inducción se obtiene un proembrión, que continua su desarrollo siguiendo una serie de etapas ontogénicas: globular, corazón, torpedo y cotiledonar, similares a las que sigue el embrión cigótico en su desarrollo (Dodeman *et al.*, 1997). Este proceso de desarrollo del embrión somático desde el estado globular hasta el cotiledonar se denomina histodiferenciación (Merkle *et al.*, 1995). Antes de la formación de embriones globulares, en la superficie del callo embriogénico aparecen unas estructuras nodulares con apariencia translúcida (Corredoira *et al.*, 2006) llamadas

proembriónes donde el signo más importante de desarrollo es la formación del protodermo que permite el paso al estado globular gracias al patrón de división de sus células (Yeung *et al.*, 1996). Formado el protodermo comienza a elongarse pasando de la simetría radial propia del embrión globular a la simetría bilateral. El transporte polar de auxinas comienza en estadios tempranos del estado globular, se forma en la parte apical, sigue hacia la zona central, para contribuir a la diferenciación del procambium y a la simetría bilateral (Liu *et al.*, 1993).

Posterior a esto viene la formación de los cotiledones que surgen como pequeñas células isodiamétricas en la periferia de la región terminal del embrión, siendo aquí donde inicia la etapa de corazón. Seguida de la etapa torpedo donde el embrión empieza a alargarse y comienza la formación del meristemo radical y meristemo apical del brote. La formación del meristemo apical es uno de los procesos más importantes de la embriogénesis, ya que el buen desarrollo del embrión somático para llegar a formar una planta, depende del desarrollo del meristemo apical que en el caso de estos embriones se desarrolla correctamente en muy pocas ocasiones (Kong *et al.*, 1999). Finalmente el embrión termina el proceso de histodiferenciación con la etapa cotiledonar, al llevarse a cabo la elongación de los cotiledones, donde podrá iniciar una etapa de maduración y posteriormente la germinación (véase apartados 3.7 y 3.8).

3.1.4 Mantenimiento de la capacidad embriogénica

Después de la inducción de los embriones somáticos, se debe llevar a cabo un sistema que permita la proliferación de los embriones somáticos procedentes del explante inicial. Siendo de suma importancia para la conservación de las líneas

embriogénicas y contar con el material necesario para las pruebas posteriores como las de maduración y germinación de los embriones somáticos. El mantenimiento se lleva a cabo mediante subcultivos del callo embriogénico o mediante embriogénesis secundaria (ver apartado 3.1.5).

Cuando el sistema embriogénico consiste en un callo embriogénico formado por masas preembriogénicas (MPE) que son masas de embriones preglobulares (Halperin, 1966) y en algunos casos con callo de tejido vegetal no diferenciado la proliferación de los embriones se produce por subcultivos de estas masas en un medio de cultivo con bajos niveles de auxinas (0.012 a 0.4 μM) (Machakova *et al.*, 2008), que proporciona el incremento de las MPE (Merkle *et al.*, 1995) obteniéndose cientos de embriones a partir de unos pocos gramos. Además de los reguladores de crecimiento influyen otros factores como la temperatura en el cual se encuentren incubados, periodo de los subcultivos, tipo de agar empleado, tipo de fuente de carbono, etc. (Raemakers *et al.*, 1995).

Aparte de los subcultivos en agar, el mantenimiento se puede llevar a cabo mediante el cultivo automatizado en biorreactores (cultivos líquidos) favoreciendo la individualización de los embriones somáticos. Este tipo de sistema se adapta al establecimiento de suspensiones celulares, lo cual ofrece un potencial para la producción en masas, puesto que dan una mayor tasa de crecimiento y productividad total (Merkle *et al.*, 1995).

Aunque el objetivo principal del mantenimiento es la multiplicación de los embriones somáticos, de igual manera es importante que se encuentren en

óptimas condiciones ya que se pueden presentar problemas de oxidación del tejido en algunas ocasiones provocado por la exudación de fenoles del tejido que conllevan al oscurecimiento y deterioro del material vegetal.

En este caso el intervalo entre subcultivos se debe ajustar según la severidad del problema. Sin embargo, éste es un procedimiento demandante de tiempo y reactivos, por lo que es aconsejable optar por otras alternativas, como la adición de algunos adsorbentes al medio de cultivo. Uno de ellos es el carbón activo (CA) que tiene la capacidad de remover sustancias inhibitorias o tóxicas del medio de cultivo, que son producidas durante el autoclavado del medio o liberadas por el explante. El *polivinil pirrolidona (PVP)* y *polivinil polipirrolidona (PVPP)* también han sido utilizados en la prevención del oscurecimiento de tejidos ya sea aplicados como enjuague al explante o mediante su incorporación al medio de cultivo (Azofeifa, 2009).

3.1.5 Embriogénesis secundaria

Raemakers *et al.* (1995) la definen como la formación de embriones somáticos en la estructura de otro embrión somático, estos embriones formados serán embriones somáticos secundarios, porque no provienen del explante inicial. Este proceso se vuelve una multiplicación recurrente de los embriones somáticos, que generalmente es elevada y aparentemente ilimitada en el tiempo (Celestino *et al.*, 2005).

Esto ocurre porque el embrión somático inicial conserva una capacidad de proliferación en su superficie, que conduce a la formación de nuevos embriones

somáticos, antes de que el embrión inicial complete su desarrollo (Raemakers *et al.*, 1995). En la mayoría de los casos estos embriones se originan a partir de la epidermis de las células de otro embrión, ya sea a partir de células individuales (Polito *et al.*, 1989) o múltiples donde es frecuente que los embriones se desarrollen fusionados, compactos, que dificulten su individualización y selección (Plata y Vieitez, 1990). En ocasiones los embriones secundarios se forman en algunas partes de los cotiledones (Plata y Vieitez, 1990), o en la parte radical (Vieitez y Barciela, 1990).

Klimaszewska *et al.* (2007) indicaron que la aparición de embriones somáticos secundarios en *P. strobus* y *P. pinaster* necesitan entre 6-8 semanas de cultivo, y en la mayoría de los casos también se forma callo sobre la totalidad del embrión somático inicial, seguido de los embriones somáticos tempranos en grupo o individuales, que surgen en la superficie del callo. Estos cultivos son difíciles de sincronizar e imposible distinguir entre los diferentes ciclos de la embriogénesis secundaria (Raemakers *et al.*, 1995).

Cuando el embrión empieza su desarrollo mediante la histodiferenciación la embriogénesis secundaria debe ser interrumpida mediante la omisión o disminución de la concentración de las auxinas, aunque en algunos casos continua probablemente por un efecto de arrastre de las auxinas (Raemakers *et al.*, 1995) por este motivo en algunas ocasiones es difícil de detenerla (Ammirato, 1977; Plata y Vieitez, 1990). Raemakers *et al.* (1995) indican que cuando el sistema de proliferación de embriogénesis secundaria se realiza con citoquininas de igual manera se dificulta detenerla cuando se desea el desarrollo del embrión.

En el caso de *Camelia raticulata* (Plata y Vieitez, 1990), y *C. japónica* (Vieitez y Barciela, 1990) el uso del AG₃ detuvo la proliferación de los embriones secundarios.

A pesar de esto, la embriogénesis secundaria es positiva en la multiplicación de los embriones somáticos, ya que en algunas especies leñosas ayuda a mantener viables las líneas embriogénicas por un largo ciclo de vida antes de ser probadas en campo. De igual manera es importante en técnicas de transformación genética o crioconservación, para mantener el material vegetal por un periodo más prolongado (Raemakers *et al.*, 1995).

3.1.6 Maduración de los embriones somáticos

Yeung (1995) define la maduración como el periodo del desarrollo embriogénico en el que se produce la expansión celular, acumulación de las sustancias de reserva y la adquisición de la tolerancia a la desecación. Los embriones deben ser expuestos a los tratamientos de maduración hasta que hayan alcanzado el desarrollo adecuado, (esto es en etapa cotiledonar) el cual se puede estimular mediante la transferencia a un medio de cultivo libre de auxinas (von Arnold *et al.*, 2002).

Por otro lado cuando el agua se pierde del tejido, provoca un estado de reposo en el embrión, en el caso de las semillas ortodoxas que después de su rehidratación conducirá a su germinación. En contraste con embriones de semillas recalcitrantes que no son capaces de sobrevivir a la desecación impidiendo el desarrollo durante la maduración (von Arnold *et al.*, 2002). Por ello la

disponibilidad del agua tiene un papel esencial durante el desarrollo y maduración de la semilla, característica que se utiliza en la maduración de los embriones somáticos, al restringir la disponibilidad de agua en el medio de cultivo aumentando el potencial osmótico que se logra incrementando la concentración de la fuente hidrocarbónada (Klimaszewska *et al.*, 2000; Raemakers *et al.*, 1991). La efectividad de la fuente hidrocarbónada como agente osmótico varía dependiendo el tipo de azúcar (sacarosa, maltosa, fructosa, etc.) y con la especie, dado que el uso de azúcares como agente osmótico, supone que una parte de azúcar es metabolizado por los embriones durante su cultivo. Carrier *et al.* (1997) y Johnson *et al.* (1997) proponen que los hidratos de carbono podrían desempeñar múltiples funciones, incluyendo la provisión de una fuente de carbono y energía, causando un efecto osmótico y también influir en el proceso de maduración del embrión, por la regulación directa de la expresión génica.

Es frecuente el uso de azúcares-alcohol que son transportados muy lentamente al interior de las células, siendo los más habituales el manitol y sorbitol (Thompson *et al.*, 1986). Además los compuestos de alto peso molecular como el polietilenglicol (PEG) puede proporcionar al medio un potencial osmótico más alto (von Arnold *et al.*, 2002), así como el incremento de la concentración de agar en el medio de cultivo (Klimaszewska *et al.*, 2000).

Con respecto a la acumulación de sustancias de reserva, se presentan las mismas características en un embrión somático que en un embrión cigótico. Siendo los cotiledones la parte del embrión donde se almacenan estas sustancias (Thomas, 1993). Sin embargo, la cantidad, el momento de su acumulación y la

composición química de los mismos, pueden variar entre los embriones somáticos y los cigóticos (Merkele *et al.*, 1995; Yeung, 1995). Los embriones somáticos en estado cotiledonar presentan menos lípidos y proteínas y más almidón que los embriones cigóticos en la misma etapa de desarrollo (Merkele *et al.*, 1995). La síntesis y la deposición de estas sustancias de reserva parecen estar reguladas por la expresión de genes inducidos por el ácido absícico (ABA) y por el estrés hídrico (Dodeman *et al.*, 1997). En otros casos, el ABA se utiliza para reducir el proceso de embriogénesis secundaria o para inhibir la germinación precoz que ocurre cuando el embrión inicia el proceso de germinación (emisión de raíz, elongación de hipocótilo o síntesis de clorofila) sin que este fisiológicamente maduro por lo que normalmente no sobrevive (Litz y Gray, 1992), un tratamiento con ABA durante un mes, es óptimo ya que en periodos prolongados puede tener un efecto negativo (von Arnold *et al.*, 2002).

El ABA participa en la transformación de carbohidratos en lípidos y proteínas (Merkle *et al.*, 1995), puede favorecer el desarrollo del meristemo apical del brote (Yeung, 1995). A pesar del efecto beneficioso del ABA aún no se conoce el papel exacto de este regulador en la estimulación del desarrollo del embrión somático (Stasolla y Yeung, 2003). Al parecer los cambios en el estado de oxidación del ácido ascórbico presente en los tejidos, podrían ser una señal fisiológica inducida por el ABA para dar comienzo al desarrollo embriogénico (Stasolla y Yeung, 2003).

Otros efectos de la presencia de ABA en el medio, son alteraciones en el metabolismo del nitrógeno, seguidos de acumulación de productos de reserva y la

síntesis de poliaminas (Stasolla y Yeung, 2003). Aunque el efecto de este regulador está relacionado con el tipo y concentración de agente osmótico empleado, puesto que por sí solo no es significativo (Etinne *et al.*, 1993).

3.1.7 Germinación y conversión a plántula

En los sistemas embriogénicos se define por germinación como la formación del brote o raíz, Merkle *et al.* (1995) la definen como la emisión de la raíz por parte del embrión, que ocurre tan pronto hay elongación del hipocótilo y extensión de la radícula, mientras que la formación simultánea de brote y raíz se denomina desarrollo de planta completa. Sólo los embriones maduros con una morfología normal que hayan acumulado suficientes materiales de almacenamiento al final de la maduración se desarrollan en plantas normales (von Arnold *et al.*, 2002).

En varios estudios se ha resaltado la importancia de ABA, agentes osmóticos, y/o tratamientos de pregerminación (deseccación, ácido giberélico (GA₃) y almacenamiento en frío) (Atree *et al.*, 1990; Merkle *et al.*, 1995; Yeung, 1995).

El GA₃ promueve la germinación de las semillas de aquellas especies que requieren un periodo de frío o cierto espectro lumínico para inducir su germinación, actuando a nivel de la división y elongación celular, de igual manera en la germinación de los embriones somáticos se emplea para estimular el crecimiento del brote (Gaspar *et al.*, 1996). La adición al medio de germinación de GA₃ provoca una reducción de los niveles endógenos de ABA e incrementa la sensibilidad al ácido giberélico (Deng y Cornu, 1992; Oishi y Bewley, 1990). En el caso de las angiospermas ha sido empleado para promover la germinación de los

embriones somáticos de *Vitis* (Pearce *et al.*, 1987) y *Camellia* (Plata y Vieitez, 1990; San Jose y Vieitez, 1993).

El medio más utilizado para la germinación de embriones es el MS (Murashige y Skoog ,1962) preferiblemente con el 50% de los macronutrientes y sin la adición de reguladores de crecimiento (Raemakers *et al.*, 1999). Sin embargo en algunos casos la adición de benciladenina (BA) favorece el desarrollo del brote, estimulando el crecimiento y la división de las células del ápice y el desarrollo del hipocótilo (Mathews y Wetzstein, 1993), y auxinas en bajas concentraciones a fin de estimular la elongación de la radícula (Michler, 1995). De igual manera la presencia del nitrato de plata (Mathews y Wetzstein, 1993) o de aminoetoxivinilglicina (AVG) (Kong *et al.*, 1999) también mejora el desarrollo de la planta, pues provocan un descenso de los niveles de etileno y la reducción de los espacios intercelulares del meristemo apical del brote. Otro compuesto que se añade es el carbón activo (Carron *et al.*, 1995; Norgaard, 1997) que adsorbe sustancias inhibitoras o tóxicas, aunque también puede adsorber algunos reguladores de crecimiento, además proporciona un grado de obscuridad y reducción en la luz propiciando una acumulación de auxinas (Pan y Van Staden, 1998). En el caso de *Picea abies*, el CA fue utilizado en combinación con ABA, en embriones somáticos, donde los resultados fueron favorables obteniéndose un aumento en la producción y calidad de los embriones somáticos mejorando el desarrollo de los cotiledones (Pullman *et al.*, 2005).

Los brasinoesteroides (BR) son hormonas esteroides con una significativa actividad promotora del crecimiento en las plantas. Además desempeñan un papel

importante en otros procesos de desarrollo, como la germinación de la semilla, rizogénesis, floración, senescencia, abscisión y la maduración, aparte de conferir resistencia a las plantas a diversos tipos de estrés abiótico (Rao *et al.*, 2002). Siendo *Brassica napus* la especie donde fue aislado el primer brasinoesteroide (BR) a partir del polen (Mitchell *et al.*, 1970).

El modo de acción de las hormonas esteroidales está relacionado con un amplio espectro de procesos fisiológicos, algunos autores lo involucran en el alargamiento del tallo y raíz, así como en la diferenciación del xilema (Iwasaki y Shibaoka, 1991). El tejido vegetativo joven es particularmente sensible a los BRs por lo que la concentración interna de éstos está directamente involucrada en el nivel celular (Clouse y Sasse., 1998) Rao *et al.* (2002) indican que los BRs promueven la germinación de semillas, invirtiendo los efectos inhibitorios del ABA.

También se informó que la aplicación exógena de diferentes concentraciones de BR, aumentó significativamente la capacidad de los explantes de plúmula coco, para formar callos embriogénicos y embriones somáticos (Azpeitia *et al.*, 2003). En el caso de algodón la aplicación exógena de BR (0.5 μM) a callos embriogénicos, de igual manera aumento el número de embriones formados (Aydin *et al.*, 2006).

No obstante, el papel que juegan los BRs en la división celular no está bien esclarecido, pues parece ser necesaria la presencia de otros reguladores del crecimiento para combinar su actividad en este proceso (García, 2000). Lu *et al.* (2003) y Núñez *et al.*, (2004), mostraron que los BRs en combinación con AIA y

BA estimularon la regeneración en *Spartina patensy* y *Lactuca sativa* L. respectivamente.

Otra hormona importante es el etileno, la única en forma de gas que se produce por todo tipo de tejido de una planta, y que además regula su crecimiento (Abeles *et al.*, 1992). La velocidad de producción de etileno en los tejidos vegetales es normalmente baja, pero durante algunas etapas de desarrollo (emergencia de semillas, maduración de ciertos frutos, marchitamiento de flores, senescencia y abscisión de hojas etc.) o frente a condiciones ambientales adversas (infección de patógenos, lesiones, deficiencia o exceso de agua, bajas temperaturas, etc.) se induce un importante incremento de la misma, que actúa como señal reguladora de las distintas respuestas fisiológicas (Zacarías, 1993).

En el caso de las plantas cultivadas de manera *in vitro*, se mantienen en recipientes que necesitan estar cerrados para impedir su deshidratación y contaminación, lo cual en ocasiones provoca la falta de oxígeno o el exceso de gases producidos como el etileno (Pierik, 1990). El etileno es acumulado en los recipientes donde se mantienen los explantes, y la concentración varía dependiendo del tipo de tejido, el peso, volumen del recipiente, forma en que se sella el recipiente y las condiciones de cultivo (Moshkov *et al.*, 2008).

3.1.8 Aclimatación de plantas cultivadas *in vitro*

Finalmente después de la obtención de plantas mediante técnicas de cultivo *in vitro* se procede a la etapa de aclimatación, que es un proceso complejo, sobre todo en especies leñosas, por lo que se debe tener un control estricto de las

condiciones ambientales (Pospíšilová *et al.*, 1999; Barry-Etienne *et al.*, 2002; Martínez-Ruiz *et al.*, 2005;).

Las plántulas cultivadas *in vitro* tienen una cutícula escasamente desarrollada y con hojas finas, blandas y fotosintéticamente poco activas, por lo cual cuando se transfieren al suelo, se produce una transpiración cuticular extra, ya que la humedad del aire en condiciones *in vivo* es más baja. Además puesto que sus estomas no son suficientemente operativos, permanecen abiertos al trasplantarse al suelo, originando un importante estrés hídrico en las primeras horas de aclimatación (Hazarika, 2003; Pierik, 1990; Pospíšilová *et al.*, 1999). Por ello las plántulas muestran un rápido marchitamiento cuando se transfieren a condiciones de invernadero, por lo que debe mantenerse una humedad relativa alta en el nuevo ambiente, para no dañar los mecanismos que mantienen el volumen de agua en la planta (Fila *et al.*, 1998).

Fila *et al.* (1998) y Pospíšilová *et al.* (1999) señalan que la aclimatación puede ser mejorada modificando el microambiente durante el desarrollo *in vitro*, por ejemplo, reduciendo la humedad relativa que causa un endurecimiento de la planta, mejorando los resultados durante el trasplante. También con el aumento de la tasa de CO₂ en los tubos de cultivo o aumentando las intensidades de luz, para producir el establecimiento autotrófico *in vitro*.

Aparte de los factores ya mencionados, la eficiencia del proceso de adaptación depende también de la elección del sustrato y de la obtención de una

relación adecuada entre los componentes de la mezcla que asegure una buena supervivencia al ser trasplantadas (Díaz *et al.*, 2004).

3.2 El linaloe

3.2.1 Descripción y distribución de la especie

El linaloe [*B. linanoe* (La Llave) Rzed., Calderón & Medina] es una especie perteneciente al género *Bursera* dentro del cual entran más de cien especies de plantas leñosas, las cuales se extienden desde los extremos suroeste y sureste de los Estados Unidos hasta el norte de Perú y de Brasil, incluyendo las Antillas y las Galápagos (Rzedowski *et al.*, 2004). La mayoría de estas especies se localizan en la vertiente pacífica de la República, principalmente en la cuenca del río Balsas (Rzedowski y Kruse, 1979). En México se conocen aproximadamente 80 de estas especies que habitan los bosques tropicales caducifolios en altitudes entre 0 y 1800 m, y una característica importante es que la mayoría de ellas producen aceites esenciales del grupo de los terpenos, que varía en cuanto a cantidad y la especie (Rzedowski *et al.*, 2004).

Linaloe es una especie endémica de México, con una distribución geográfica conocida en los estados de Guerrero, Morelos, Puebla y Oaxaca (Rzedowski *et al.*, 2004). Especie propia del sector oriental de la depresión del Balsas y también de las cuencas del Papaloapan y del río Tehuantepec (Rzedowski *et al.*, 2005). Habita frecuentemente en el bosque tropical caducifolio el cual se encuentra con una estacionalidad muy marcada en la precipitación, con una estación seca bien definida, de 5-7 meses de duración. La temperatura media en la que se encuentran los sitios del linaloe está entre los 20 y 29 °C, con una

mínima de 5 a 6 °C y una máxima de 38 °C, la precipitación de dichos sitios varía de entre 300 y 1500 mm (Hernández-Pérez *et al.*, 2011).

Se encuentra en altitudes entre 550 y 1519 m, pendientes entre 25 y 60 %, en sustratos metamórficos e ígneos, pedregosidad entre 20 y 30 %, pH de 5 a 8, materia orgánica entre 1.8 y 8 % (Cruz-Cruz *et al.*, 2009a). Florece de mayo a principios de julio y fructifica entre julio y septiembre, con inflorescencias que varían entre 1-5 frutos, encontrándose desprovisto de follaje de noviembre a mayo (Cruz-Cruz *et al.*, 2009b; Rzedowski *et al.*, 2004).

Durante años fue conocida con los nombres de: *B. aloexylon* y de *B. delpechiana*, y con varios nombres comunes como: copalillo, lináloe, linanoé, ulinoé. inanué, linalué, ulinalué, xochicopal.

Datos taxonómicos (Espinosa, 2007):

Reino: Plantae Haeckel, 1866

División: Magnoliophyta Cronquist, Takht. & W. Zimmerm., 1966

Clase: Magnoliopsida Cronquist, Takht. & W. Zimmerm., 1966

Subclase: Rosidae Takht., 1966

Orden: Sapindales Benth. & Hook., 1862

Familia: Burseraceae Kunth, 1824

Género: *Bursera* Jacq. ex L., 1762

Especie: *B. linanoe* (La Llave) Rzed., Calderón & Medina, 2004

Rzedowski *et al.* (2005) lo describen como un árbol dioico o a veces polígamo-dioico, de 8 a 10 m de alto, muy resinoso, con aroma agradable; tronco hasta de 60 cm de diámetro, con corteza gris-rojiza, no exfoliante, ramillas lignificadas rojizas oscuras; hojas compuestas (foliolos 3 hasta 7), foliolos ovados

a elípticos, fruto ovoide, algo comprimido, de 9 a 11 mm de largo, semilla de 5 a 6 mm de diámetro color negro. Las flores se dan en inflorescencias tipo racimo de 6-8 cm, los sépalos son 4, verdes, pubescentes, cubiertos con pelos simples y alinos, envuelven cuatro pétalos de color blanco, los que a su vez en las flores masculinas, resguardan 8 estambres que adquieren un color amarillo intenso proporcionado por el polen, el cual es de ese color. Las flores femeninas tienen un gineceo en forma de botella con el estilo color verde y el estigma color blanco y bifurcado.

3.2 2 Importancia de la especie

A nivel nacional los esfuerzos y la mayor parte de los estudios ambientales se han dirigido hacia las selvas altas perennifolias y bosques templados. Ha sido en estos últimos años que se está promoviendo las investigaciones hacia las selvas bajas caducifolias (CONANP Y SEMARNAT, 2005). Estas selvas sufren de una alta deforestación, lo cual hace inminente la propagación de sus especies nativas, entre ellas *B.linanoe* (Bonfil-Sanders *et al.*, 2008).

El árbol de linaloe debe su demanda a dos características especiales; el fino aroma de su aceite esencial y la consistencia suave de su madera utilizada para la elaboración de artesanías (Hersch *et al.*, 2004). En el periodo de los cuarenta, cincuenta y sesenta del siglo XX, el auge de este producto aromático tuvo lugar principalmente para su exportación en otros países entre ellos Estados Unidos y Alemania (Solares-Arenas *et al.*, 2009). Tan atractivo resultó este producto que unos ingleses se llevaron propágulos de plantas mexicanas a la

India, país que en la actualidad abastece de tal sustancia a las industrias especializadas en diferentes partes del mundo (Rzedowski *et al.*, 2005).

El usar la madera como materia prima para la extracción del aceite, ha provocado una disminución y un daño considerable en las poblaciones naturales (Solares-Arenas *et al.*, 2009). Sin duda es de suma importancia el estudio especies de algún tipo de importancia económica, sobre todo porque esta es una especie endémica de México con una importancia cultural y más aún por su baja tasa de propagación mediante semilla.

3.2.3 Propagación de linaloe

La propagación de las especies de *Bursera* es muy escasa pero muy importante especialmente para algunas especies como *B. glabrifolia* y *B. linanoe*, que han ido disminuyendo notablemente gracias a que son utilizadas para elaborar artesanías (Purata *et al.*, 2004). Pero en México pocas especies de selva baja se propagan actualmente, y sólo unas cuantas especies de *Bursera* se propagan por estacas (Bonfil *et al.*, 2007). Castellanos-Castro y Bonfil –Sanders (2010) evaluaron la supervivencia y el crecimiento de plantas producidas por estacas de *Bursera glabrifolia*, *B. linanoe* y *B. copallifera* en diversos ambientes donde la supervivencia fue más alta en *B. linanoe*, con mayor incremento en el diámetro y la altura de las plantas en campo, una mayor tasa relativa de crecimiento y un buen desarrollo del sistema radicular en comparación con. *B. glabrifolia* y *B. copallifera*.

En otro caso para *B. linanoe*, López-Salvador *et al.* (2011), obtuvieron un 83 % de enraizamiento en estacas juveniles, mientras que Arellano-Ostoa *et al.* (2012), consiguieron un porcentaje de enraizamiento del 28 % en estacas tomadas de renuevos basales y estacas de la parte aérea (copa) de árboles adultos.

En cuanto a germinación de semillas de *Bursera* se reportan pocos estudios pero destacan los de baja germinación (Andrés- Hernández y Espinosa-Organista, 2002) y aun así bajo condiciones naturales, la germinación es frecuentemente menor que en laboratorio o invernadero (Ortiz-Pulido y Pavon, 2010). Pocos estudios publicados evalúan el efecto de diferentes tratamientos pregerminativos en *Bursera*, uno en la especie *B. penicillata* (DC.) Engl. (Nargaraja y Farooqi, 1989), otro en *B. bicolor* (Willd. ex Schltld.) Engl., *B. bipinnata* (DC.) Engl., *B. copallifera* (Sessé & Moc. ex DC.) Bullock, *B. fagaroides* (H.B.K.) Engl., *B. glabrifolia* (H.B.K.) Engl., y *B. grandifolia* (Schltld.) Engl., donde en este último se obtuvieron porcentajes de germinación muy bajos debidos a una alta proporción de semillas vanas (Bonfil-Sanders *et al.*, 2008).

El linaloe es un árbol dioico, lo cual significa que las flores funcionales femeninas y masculinas, se encuentran en individuos distintos, lo que garantiza que las nuevas generaciones constituyan una combinación de genes procedente de individuo sexual y genéticamente diferentes por lo cual la reproducción sexual incrementa la variación genética y por lo tanto la diversidad fenotípica (Cruz-Cruz *et al.*, 2009a). La colecta de semillas es una dificultad en esta especie ya que no se produce la misma cantidad y calidad, porque la maduración de estas ocurre de manera asincrónica. Por otro lado el porcentaje de germinación es muy bajo

(aproximadamente el 41 %) determinado por la baja proporción de semilla viable (Cruz-Cruz *et al.*, 2009b).

3.2.4 Características de la madera y existencias reales de linaloe

En cuanto a las características de la madera del árbol de linaloe podemos destacar que los arboles de sexo femenino presentan un mayor número de canales gomíferos en la madera, por lo tanto una mayor cantidad de aceite, también es más pesada y más resistente; en general la madera de esta especie de acuerdo con sus características anatómicas y sus propiedades físicas, es apropiada para la elaboración de artesanías, donde su principal característica es el aroma, el color blanco y maleabilidad (Borja de la Rosa *et al.*, 2009).

De las ochenta especies del genero *Bursera*, registradas en México la mayoría son árboles y arbustos característicos y poco dominantes en los bosques tropicales caducifolios (Rzedowski *et al.*, 2004). Las comunidades naturales de linaloe se encuentran fragmentadas y los individuos muy dispersos, con una proporción de edades y sexos desconocida (Gómez-Cárdenas *et al.*, 2009) y generalmente los mejores manchones se localizan en lugares inaccesibles. Además en los bosques tropicales secos la estacionalidad de la precipitación genera condiciones ecológicas más drásticas, por lo que las acciones de restauración tienen desafíos que requieren del desarrollo de protocolos específicos de reintroducción de plantas nativas (Castellanos-Castro y Bonfil-Sanders, 2010).

Ayala (2009), realizó un inventario para determinar el área de distribución del linaloe, mediante la utilización de un muestreo sistemático por conglomerados, basado en la metodología del Inventario Nacional Forestal y de Suelos de la CONAFOR. Considerando la distribución de linaloe reportada por la CONABIO en los estados de Puebla, Morelos, Guerrero y Oaxaca. La superficie inventariada, fue de 1'174,934 hectáreas de las cuales alrededor de 152,589 ha actualmente cuentan con ejemplares de linaloe, siendo Puebla el estado con mayor presencia de linaloe.

3.2.5 Usos de linaloe

En los tiempos prehispánicos se extraía la resina del linaloe destinada para uso religioso. Fue hasta cuando llegan los españoles cuando se intensifica los usos del aceite (linalol) y la madera (Gómez-Cárdenas *et al.*, 2009; Hersch *et al.*, 2004; Rzedowski *et al.*, 2004).

Huaxtla, Morelos fue una de las comunidades donde años atrás se utilizaba la madera para la extracción del aceite, cuando se utilizaba madera calada, de un depósito donde se derribaba 10 árboles se obtenían 12 litros de aceite, mientras con madera limpia solo dos litros, pero hasta que se presentó el problema de insuficiencia del número de árboles se comenzó a utilizar el fruto como materia prima (Hersch *et al.*, 2004), como en las comunidades de Chimalacatlan, Morelos y Mezquitlan, Guerrero que existen dos grupos organizados que realizan la extracción del linalol a partir del fruto mediante la técnica de arrastre de vapor de agua, en la primera de las comunidades también elaboran algunos subproductos

del aceite como velas y jabones aromáticos, pero el principal uso del linalol es para el consumo interno y para la exportación a la industria de la perfumería europea y estadounidense (Solares-Arenas *et al.*, 2009). El aceite también tiene uso medicinal, utilizado para contrarrestar los piquetes de alacrán, hongos en la piel, dolores de cabeza y neuralgias (Rzedowski *et al.*, 2005).

Además de estos usos el linaloe es utilizado para la elaboración de artesanías especialmente en la región de Olinalá Guerrero, donde se elaboran cajitas de madera, cuidadosamente decoradas por los artesanos de la región, con una distinción especial “el aroma del linaloe (Rzedowski *et al.*, 2005), que son conocidas nacional e internacionalmente. Años atrás buscaban utilizar parte del fuste del árbol que contara con la característica del jaspe en la madera ya que esta aumenta el aroma en la caja y su valor comercial, pero hoy en día cerca del 80 % son fabricadas con otras maderas como pino o copal debido a la notable disminución de las poblaciones de linaloe (Borja de la Rosa *et al.*, 2009).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización del Experimento

El trabajo de investigación se realizó de enero de 2011 a enero de 2013. La parte de cultivo *in vitro* fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología del Programa de Fruticultura, y la evaluación de aclimatación de plántulas provenientes de embriones somáticos se llevó a cabo en el invernadero de dicho programa, ubicado en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México.

4.2 Material Vegetal

Para la mayoría de los experimentos se utilizaron tres líneas embriogénicas de linaloe [*Bursera linanoe* (La Llave) Rzed., Calderón & Medina]: LEL 61-4, LEL B-3 y LEL PUE-6 obtenidas en el Laboratorio de Biotecnología del Programa de Fruticultura del Colegio de Postgraduados, las cuales consistieron en callos y embriones somáticos, inducidos a partir de secciones de hojas jóvenes y cotiledones de plántulas germinadas *in vitro*, de árboles nativos y/o seleccionados (Arellano-Ostoa *et al.*, 2009; Arellano-Ostoa *et al.*, 2011).

4.3 Proliferación y mantenimiento del callo embriogénico

4.3.1 Efecto del carbón activo adicionado al medio de multiplicación de tres líneas embriogénicas

El experimento se realizó con la finalidad de obtener la composición del medio de cultivo más adecuado para la multiplicación y mantenimiento del material embriogénico. Además determinar la tasa de multiplicación de las líneas embriogénicas LEL 61-4, LEL PUE-6 y LEL B-3. Los medios fueron los siguientes; 1) sales modificadas del MS (Murashige y Skoog, 1962) (NH_4NO_3 a 10 mM, KNO_3 a 8 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a 3 mM y eliminación del IK de los micronutrientes identificado con las iniciales (MM) y 2) MS con los macronutrientes al 50 % (M50). Suplementados con 0.027 μM de ANA, 0.022 μM de BA, 30 g L^{-1} de sacarosa, 6 g L^{-1} de agar. Ambos medios combinados con y sin 1 g L^{-1} de carbón activo (M50 con CA) y (MM con CA). El pH se ajustó a 5.7, se esterilizaron en autoclave durante 18 minutos a 121 °C. El medio se vació en placas de Petri, 20 ml por caja en la campana de flujo laminar.

Para la siembra *in vitro* se utilizó como explante masas embriogénicas que consistieron en grupos de 10 embriones. Se colocaron 10 explantes en una placa de Petri, con tres placas por cada línea embriogénica (12 placas en total por línea) y un total de nueve placas por tipo de medio, evaluándose 360 explantes en total. Los embriones somáticos se seleccionaron con aspecto verde evitando la selección de material necrótico y los embriones se tomaron en etapa globular. Se mantuvieron en cuarto de incubación expuestos a 16 h luz y 8 de oscuridad, a 25 °C \pm 2 °C de temperatura.

El experimento se evaluó 30 días después de la siembra, la primera variable fue número de embriones por etapa ontogénica (globular, corazón, torpedo y cotiledonar) y la coloración evaluando el porcentaje de explantes o masas embriogénicas de color verde (verde 140A), verde claro (amarillo-verde 149B) y necrótico (Marrón 200A), los colores fueron calificados mediante la RHS Colour Chart (The Royal Horticultural Society). El experimento se repitió dos veces en el tiempo y se utilizó un diseño experimental factorial completamente al azar de 4x3x3, considerándose como unidad experimental a un grupo de 10 embriones. Cabe mencionar que los porcentajes en color fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arccos X^{1/2}$. Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SAS versión 6.1. Para determinar el efecto de los tratamientos, en caso de existir, se aplicó una prueba de separación de medias de Tukey, con un 95% de confianza.

4.3.2 Producción de etileno en las líneas embriogénicas LEL 61-4, LEL PUE-6 y LEL B-3.

El objetivo de este ensayo fue determinar si la producción de etileno es mayor en la línea LEL B-3 que en las LEL 61-4 y LEL PUE-6, debido que esta primera ha presentado problemas frecuentes de necrosis.

El experimento consistió en la medición del etileno en callos embriogénicos de las líneas anteriores, se sembraron cuatro frascos gerber por línea embriogénica, como testigo se dejó un frasco sin material vegetal. Las mediciones se realizaron cada semana, durante 6 semanas con un total de 98 muestras.

Se empleó como medio cultivo el MS con los macronutrientes al 50%, suplementado con 0.027 μM ANA, 0.022 μM de BA, 30 g L^{-1} de sacarosa, 6 g L^{-1} de agar. Se sirvió 20 mL por frasco gerber, se taparon con tapas de plástico a las que les fue adherida una goma para permitir la toma de la muestra cada siete días con jeringa. Para posteriormente ser esterilizados por 18 minutos a una temperatura de 120 °C. Previo a esto se tomó el volumen del frasco (140 mL), peso del frasco (95.60 g) y peso del frasco con el medio de cultivo (109.50 g).

La siembra se realizó en la campana de flujo laminar, se pesó el callo embriogénico, se colocó en cada frasco, se taparon los frascos y se sellaron con plástico parafilm. Posteriormente los frascos se colocaron en el cuarto de incubación bajo un ambiente controlado, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

La toma de las muestras también se realizó en la campana de flujo laminar para evitar la contaminación del material vegetal, para esto se utilizaron jeringas de 10 mL, se tomaron muestras de 6 mL de etileno, se inyectaron en vacutainer de 7 mL. Posterior a esto se inyectó 1 mL por muestra en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard Modelo 5990 Serie II, equipado con columna capilar Poraplot Q. Las condiciones isotérmicas fueron 80 °C en el horno, 150 °C el inyector y 170 °C tanto del detector de conductividad térmica (TDC) como del detector de ionización de flama (FID). También se inyectó el estándar de CO_2 (INFRA®) y etileno (INFRA®) a concentraciones de 492 $\mu\text{L L}^{-1}$ y 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ respectivamente. Los datos se expresaron en mL de $\text{CO}_2 \text{ kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ y $\mu\text{L de C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1}\text{h}^{-1}$.

4.4 Maduración de embriones somáticos

4.4.1 Efecto de la sacarosa en la maduración de embriones somáticos

Para este ensayo se empleó como medio de cultivo el MS, con los macronutrientes al 50 %, suplementado con 0.027 μM de ANA, 0.022 μM de BA, 6 g L^{-1} agar, y 1 g L^{-1} de carbón activo. Los tratamientos para determinar la mejor respuesta de maduración en embriones somáticos de linaloe en base a la concentración de sacarosa fueron 3 %, 4 %, 6 % y 8 %. El medio de cultivo se vació en tubos de ensaye de 25 x 150 mm colocando 10 ml en cada tubo. Los tubos se taparon y se colocaron en gradillas para su esterilización, la cual se realizó por 18 minutos en una autoclave a una temperatura de 121 °C y 1 kg/cm^2 de presión. Posteriormente se dejó solidificar a temperatura ambiente.

En este caso se aislaron embriones somáticos de aproximadamente 5 mm de longitud, de color verde, en etapa torpedo provenientes de las líneas LEL 61-4, LEL PUE-6 Y LEL B-3. Se colocó un embrión por tubo de ensayo, los tubos se taparon con tapones de polipropileno y se sellaron con plástico film. Permanecieron por 30 d en el cuarto de incubación con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 de oscuridad, a 25 °C \pm 2 °C de temperatura.

Finalizado el periodo se evaluaron la elongación del embrión, de cotiledones y de raíz. Además porcentaje de embriones elongados, embriones con cotiledones, embriones con raíz, embriones maduros, embriones con raíz \geq 5mm, embriones con desarrollo de brote apical, embriones con desarrollo de embriogénesis secundaria, embriones con desarrollo de callo y supervivencia. El experimento se repitió dos veces en el tiempo. Los porcentajes fueron

previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arccos(X^{1/2})$. Se utilizó un diseño experimental factorial completamente al azar de 4×3 , considerando un embrión como unidad experimental. Analizado con el paquete estadístico SAS versión 6.1., (SAS, 2002). Para determinar el efecto de los tratamientos, en caso de existir, se aplicó el test de separación de medias de Tukey, con un 95% de confianza.

4.4.2 Efecto de la maltosa en la maduración de embriones somáticos

Se empleó como medio de cultivo el MS, con los macronutrientes al 50%, suplementado con $0.027 \mu\text{M}$ de ANA, $0.022 \mu\text{M}$ de BA, 6 g L^{-1} agar, y 1 g L^{-1} de carbón activo. Los tratamientos para determinar la mejor respuesta de maduración en embriones somáticos de linaloe en base a la concentración de maltosa fueron (3 %, 4 %, 6 % y 8 %). El medio de cultivo se vació en tubos de ensaye de 25 x 150 mm colocando 10 ml en cada tubo. Los tubos se taparon y se colocaron en gradillas para su esterilización, la cual se realizó por 18 minutos en una autoclave a una temperatura de $121 \text{ }^\circ\text{C}$ y 1 kg/cm^2 de presión. Posteriormente se dejó solidificar a temperatura ambiente.

En este caso se aislaron embriones somáticos de 5 mm de longitud, de color verde en etapa torpedo, provenientes de las líneas LEL 61-4 y LEL PUE-6, colocando un embrión por tubo de ensayo se taparon con tapones de polipropileno y se sellaron con plástico film. Permanecieron por 30 d en el cuarto de incubación con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 de oscuridad, a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura.

Finalizado el periodo se evaluaron: elongación del embrión, de cotiledones y de la raíz. Además porcentaje de embriones elongados, embriones con cotiledones, embriones con raíz, embriones maduros, embriones con raíz $\geq 5\text{mm}$, embriones con desarrollo de brote apical, embriones con desarrollo de embriogénesis secundaria, embriones con desarrollo de callo y supervivencia. El experimento se repitió dos veces en el tiempo. Los porcentajes fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arccos(X^{1/2})$. Se utilizó un diseño experimental factorial completamente al azar de 4×2 , con 10 repeticiones por tratamiento considerando un embrión como unidad experimental. Fue analizado con el paquete estadístico SAS versión 6.1., (SAS, 2002). Para determinar el efecto de los tratamientos, en caso de existir, se aplicó el test de separación de medias de Tukey, con un 95% de confianza.

4.4.3 Efecto del ácido abscísico y polietilenglicol en la maduración de embriones somáticos

Al igual que en los ensayos anteriores se utilizó un medio de cultivo con los macronutrientes al 50 %, suplementado con 40 g L^{-1} de maltosa y 6 g L^{-1} de agar. Para este caso los tratamientos fueron: PEG 8000 al 5 %, PEG 8000 al 6 %, ABA $3.78 \mu\text{M}$ y ABA $7.57 \mu\text{M}$. La solución de ABA fue filtrada (filtro millipore $0.22 \mu\text{m}$) en la campana de flujo laminar y aplicada al medio antes de que el agar se solidificara, para posteriormente vaciar el medio en placas Petri de vidrio previamente esterilizadas.

Se aislaron embriones somáticos de 5 mm de longitud de color verde en etapa torpedo provenientes de la línea LEL 61-4. Se colocaron en placas Petri y se sellaron con plástico film. Permanecieron por 30 d en el cuarto de incubación con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 de oscuridad, a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura.

Finalizado el periodo se evaluaron: elongación del embrión, elongación de cotiledones, elongación de la raíz. Además porcentaje de embriones elongados, embriones con cotiledones, embriones con raíz, embriones maduros, embriones con desarrollo de embriogénesis secundaria, embriones con desarrollo de callo y supervivencia. Los porcentajes fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arccos X^{1/2}$. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro niveles, con 40 repeticiones por tratamiento, considerando un embrión como unidad experimental con un total de 160 embriones. Este fue analizado con el paquete estadístico SAS versión 6.1., (SAS, 2002). Para determinar el efecto de los tratamientos, en caso de existir, se aplicó el test de separación de medias de Tukey, con un 95 % de confianza.

4.5 Germinación de embriones somáticos

4.5.1 Efecto de brasinoesteroides sobre la germinación de embriones somáticos

Para este ensayo de germinación el medio de cultivo fue el MS con los macronutrientes al 50 %, suplementado con $0.027\text{ }\mu\text{M}$ ANA, $0.022\text{ }\mu\text{M}$ de BA, 30 g L^{-1} de sacarosa, 6 g L^{-1} de agar, los tratamientos para determinar la mejor respuesta de germinación en embriones somáticos de linaloe en base a la concentración de Brasinoesteroide fueron 0, 0.002, 0.02, 0.2 mg L^{-1} . El reactivo

fue filtrado en la campana de flujo laminar y aplicado al medio antes de que el agar se solidificara, para posteriormente vaciar el medio en los tubos de 25 x 150 mm colocando 10 mL por tubo de ensaye previamente esterilizados.

Se aislaron embriones somáticos de 10 mm de longitud de color verde en etapa cotiledonar (descartando embriones deformes), provenientes de callo embriogénico de la línea embriogénica LEL 61-4, posteriormente se sembró un embrión por tubo de ensaye se taparon con tapones de polipropileno y se sellaron con plástico film. Permanecieron por 30 d en el cuarto de incubación con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 de oscuridad, a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura.

Finalizado el periodo se evaluó: elongación del embrión, elongación de cotiledones, elongación de la raíz. Además porcentaje de embriones elongados, embriones con cotiledones, embriones con raíz $\geq 5\text{ mm}$, embriones con desarrollo de brote apical, embriones con desarrollo de embriogénesis secundaria, embriones con desarrollo de callo y supervivencia. Los porcentajes fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arccos(X^{1/2})$. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro niveles con 20 repeticiones cada tratamiento, se consideró un embrión como unidad experimental. Se analizó con el paquete estadístico SAS versión 6.1., (SAS, 2002). Para determinar el efecto de los tratamientos, en caso de existir, se aplicó el test de separación de medias de Tukey, con un 95 % de confianza.

Posterior se eligió la mejor concentración de BR (0.002) para evaluarla en conjunto con dos fuentes de carbono sacarosa 4 % y maltosa 4 %, el medio de

cultivo fue el ya mencionado, y los embriones se eligieron con las características también expuestas (de la línea embriogénica LEL PUE-6).

4.5.2 Efecto del ácido giberélico y maltosa sobre la germinación de embriones somáticos

Para este ensayo de germinación el medio cultivo fue el MS con los macronutrientes al 50 %, suplementado con 30 g L⁻¹ de maltosa, 6 g L⁻¹ de agar, los tratamientos para determinar la mejor respuesta de germinación en embriones somáticos de linaloe en base a la concentración de AG₃ fueron 0, 0.001, 0.01 y 0.1 mg L⁻¹. El reactivo fue filtrado en la campana de flujo laminar y aplicado al medio antes de que el agar se solidificara, para posteriormente vaciar el medio en los tubos de 25 x 150 mm colocando 10 mL por tubo de ensaye previamente esterilizados.

Se aislaron embriones somáticos de 10 mm de longitud aproximadamente de color verde intenso opaco en etapa cotiledonar (descartando embriones deformes), provenientes de callo embriogénico de la línea embriogénica LEL-PUE-6, posteriormente se sembró un embrión por tubo de ensaye se taparon con tapones de polipropileno y se sellaron con plástico film. Permanecieron por 30 d en el cuarto de incubación con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 de oscuridad, a 25 °C ± 2 °C de temperatura.

Finalizado el periodo de cultivo se evaluaron: elongación del embrión, elongación de cotiledones, elongación de la raíz. Además porcentaje de embriones elongados, embriones con cotiledones, embriones con raíz ≥ 5mm,

embriones con desarrollo de brote apical, embriones con desarrollo de embriogénesis secundaria, embriones con desarrollo de callo y supervivencia. Los porcentajes fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arccos X^{1/2}$. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres niveles con 20 repeticiones cada tratamiento, se consideró un embrión como unidad experimental. Se analizó con el paquete estadístico SAS versión 6.1., (SAS, 2002). Para determinar el efecto de los tratamientos, en caso de existir, se aplicó el test de separación de medias de Tukey, con un 95 % de confianza.

4.6 Aclimatación de plántulas provenientes de embriones somáticos en invernadero

Para la realización de este proceso se utilizaron plántulas de 2.7 ± 0.2 cm de altura, provenientes de ocho líneas embriogénicas (LEL B-4, LEL 61-4, LEL SD, LEL C-7, LEL B-3, LEL PUE-6, LEL 2011, LEL 54) mantenidas en un medio MS con los macronutrientes al 50 % con nitrato de plata y carbón activo.

Como primera etapa las plántulas fueron retiradas de la condición *in vitro* y trasplantadas a sustrato. Al retirarlas se lavaron las raíces cuidadosamente con agua destilada, para eliminar restos de agar, y evitar la proliferación de patógenos en el sustrato. Para el trasplante se utilizaron contenedores individuales tipo tubetes de color negro de polipropileno de 100 cm³. Los tubetes se llenaron con las mezclas de sustrato a tres cuartos de su capacidad. El sustrato se esterilizó en autoclave durante 45 minutos a una temperatura de 121 °C, se dejó reposar por

dos días, posterior a esto, se agregó al sustrato 1.5 g L^{-1} de fertilizante de liberación controlada (Osmocote® Plus) 15-9-12 de $\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$.

Los tratamientos a probar consistieron en dos tipos de sustrato: 1) aserrín compostado y perlita (agrolita) (60:40, v/v) y 2) tezontle, corteza de pino compostada y turba de musgo (peat moss) (30:30:40, v/v/v). Los tubetes se colocaron en una mesa portatubetes de polipropileno de 49 cavidades (369 mm largo x 337 mm ancho x 184 mm alto). Se realizó un primer riego con las sales minerales del MS reduciendo los macronutrientes al 25 %, por último se colocó la mesa dentro de una caja de plástico transparente y se tapó con la tapa del mismo material para mantener una alta humedad relativa. Estas permanecieron por 30 días en un cuarto de incubación con un fotoperiodo de 16 horas luz 8 de oscuridad, donde se fue retirando la tapa de la caja gradualmente.

Pasados 30 días se sacaron las plantas de la caja de plástico y fueron llevadas al invernadero, donde se alternó la aplicación de fungicidas (captan y tecto) y fertilizante cada 15 días. Fueron regadas, cada tercer día o dependiendo de los requerimientos de las plantas. En esta etapa de invernadero se tomaron mediciones cada mes registrando altura, diámetro y número de hojas nuevas. La altura se midió en cm desde la base del tallo hasta la yema apical. El diámetro se midió en mm en la base del tallo.

Después de seis meses en la condición *ex vitro* se tomó una muestra de 12 plantas al azar (seis por tratamiento) para evaluar la parte aérea y radical. Las variables evaluadas fueron: número de raíces primarias, secundarias y terciarias

mayores a 5 mm, longitud de raíces y peso de raíz. Respecto a la parte aérea se separaron las hojas del tallo midiendo el área foliar con un integrador de área foliar.

Para evaluar biomasa las muestras se colocaron en bolsas de papel, se secaron en estufa a 70 °C, hasta peso constante (72 h); transcurrido ese periodo, se pesaron por separado la parte aérea y la radical en una balanza analítica.

Con la finalidad de hacer una descripción de los estomas de las plantas provenientes de embriones somáticos se tomaron como muestras una hoja de planta somática en condición *in vitro*, una hoja de planta somática aclimatada en invernadero y una hoja de estaca procedente de árbol adulto de campo. Se cortaron fragmentos de 5 x 3 mm de ambos lados de la nervadura central de un foliolo de cada hoja. Dichas muestras se fijaron en glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de fosfatos Sorensen's 0.1M pH 7.2 (Ruzin, 1999) durante 24 horas. Posteriormente se realizaron tres lavados consecutivos con amortiguador de fosfatos antes mencionado, quince minutos en cada cambio. Los tejidos se deshidrataron en una serie de etanol gradual (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 %) por 50 min en cada concentración. Las muestras se secaron a punto crítico en una secadora modelo (Sandri-780A), se colocaron y orientaron sobre portamuestras metálico usando cinta doble adhesiva de carbón y se recubrieron con oro durante 4 minutos en una ionizadora (Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat) (Bozzolla y Russell, 1992). Las muestras se observaron y fotografiaron en un Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM 6390) operando a 15 Kv.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Proliferación y Mantenimiento del callo embriogénico

5.1.1 Efecto del carbón activo en la multiplicación de tres líneas embriogénicas

Al aislar embriones somáticos y cultivarlos en el medio de multiplicación, tiene lugar al proceso de embriogénesis adventicia, originándose de forma directa embriones somáticos secundarios. En el caso de linaloe cuando el embrión aislado se encuentra en etapa cotiledonar, estos embriones secundarios se forman fundamentalmente en el polo radical y en menor medida en los cotiledones del embrión somático primario, este proceso es asincrónico, coexistiendo embriones prácticamente en todas las etapas de desarrollo. En ocasiones se presenta la unión entre el embrión secundario y el tejido del embrión del que procede, impidiendo realizar tratamientos de individualización (Figura 1) y selección para sincronizar el estado de desarrollo de los diferentes embriones secundarios, además de la fusión entre varios embriones secundarios, causada probablemente por el modo en que estos embriones se originan.



Figura 1. Embrión somático en etapa cotiledonar del clon LEL 61-4 con embriones somáticos secundarios en distintos estadios de desarrollo en la radícula e hipocótilo. Dichos embriones están fusionados entre sí y son difíciles de separar.

Por tal motivo para este experimento se consideró aislar masas embriogénicas compuestas por 10 embriones somáticos en estado globular, las cuales fueron consideradas como un explante y cultivadas en los medios de multiplicación de prueba (Figura 2).

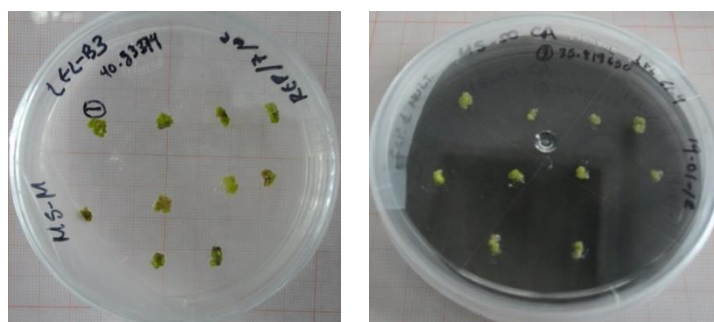
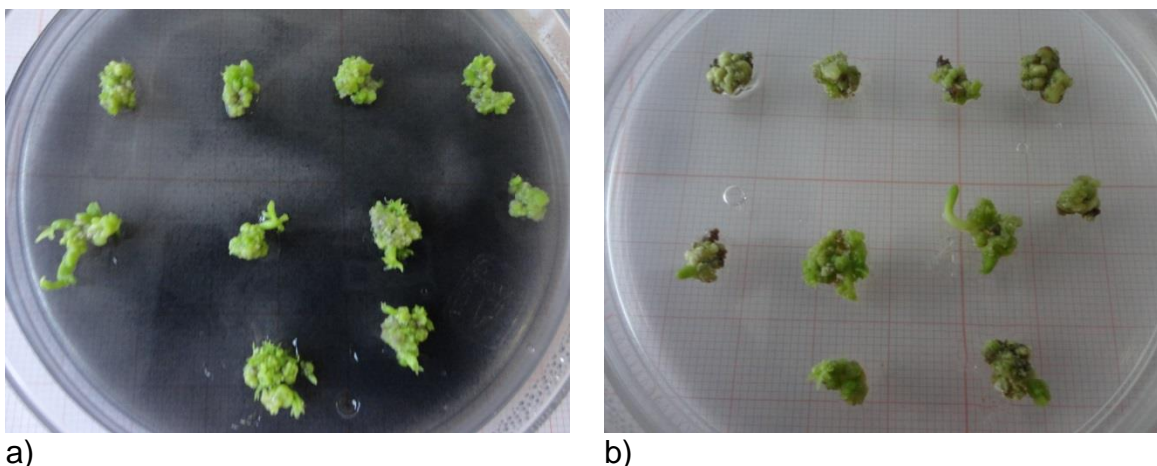


Figura 2. Proliferación de los cultivos embriogénicos en placas Petri (cada grupo se consideró un explante).

En todos los medios durante la primera semana de cultivo, no se observó ningún cambio en los explantes, al paso de dos semanas solo se observó un ligero incremento de tamaño de los embriones y no fue sino hasta la tercera semana cuando se empezó a distinguir el crecimiento de nuevos embriones somáticos, y aparecieron de forma individual o en grupos. En estos embriones secundarios obtenidos, se observaron todos los estadios de desarrollo ontogénico: globular, corazón, torpedo y cotiledonar con una coloración verde y de fácil separación entre ellos.

El número total de embriones obtenidos por explante, resultó significativamente ($p \leq 0.0001$) mayor en los medios de cultivo adicionados con carbón activo (MM CA 32.1 y 27.6 % con M50 CA) (Cuadro 1) (figura 3).



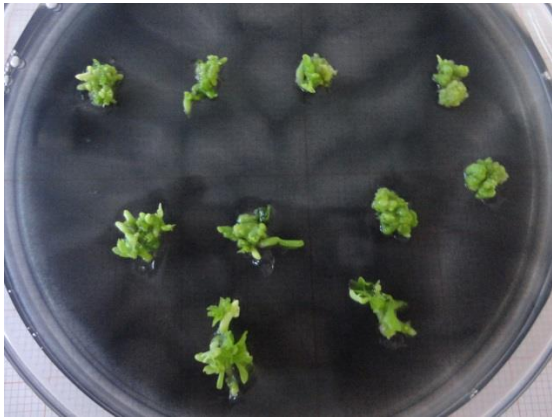
a) Masas embriogénicas (LEL PUE-6) en el medio M50 con carbón activo. b) Masas embriogénicas (LEL PUE-6) en el medio M50 sin carbón activo.

Con relación al número de embriones por estadio solamente se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.0003$) en la etapa globular y fue mayor en los medios con carbón activo.

Se encontraron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.0001$) en la apariencia o coloración de las masas embriogénicas, donde los medios M50 con CA y MM con CA tienden a producir porcentajes mayores (84.3 y 77.4 %, respectivamente) de embriones con mejor aspecto en base a su coloración verde (140A). Por consiguiente, los porcentajes de necrosis en las masas embriogénicas desarrolladas en estos medios son más bajos (3.7 y 5.7 %) con respecto a los medios sin carbón activo (Cuadro 2).

Esto nos indica que existe una influencia positiva del carbón activo en la apariencia y estado o calidad del material vegetal. Cabe mencionar que en aquellas masas que presentaron la coloración verde, también presentaron embriones con menor proporción de deformaciones y una mayor facilidad para su separación entre ellos.

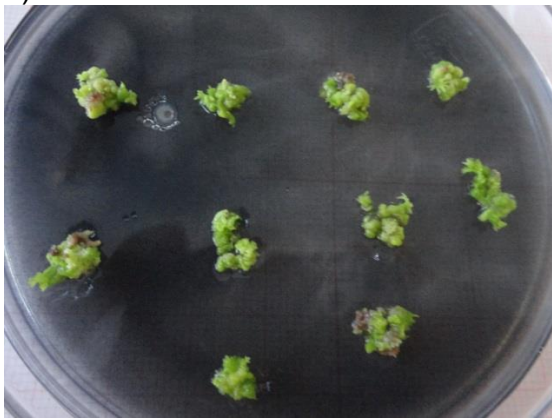
Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.002$) para el número total de embriones por explante, entre las tres líneas embriogénicas evaluadas. Las que presentaron el mayor número fueron la LEL 61-4 y LEL PUE-6 (Cuadro 1). Además se encontró diferencia altamente significativa ($p \leq 0.0001$) entre los porcentajes de coloración de las masas, resultando con el mejor porcentaje de verde la LEL 61-4 (86.9 %) y por el contrario la línea LEL B-3 resultó con el mayor porcentaje de necrosis (25.1 %), problema que fue evidente en la segunda semana de cultivo (Figura 4). Estos resultados nos indican que existe diferencia entre genotipos en cuanto al crecimiento y desarrollo de los embriones somáticos.



a)



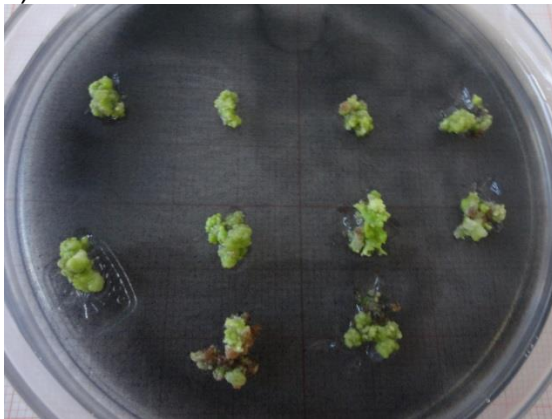
b)



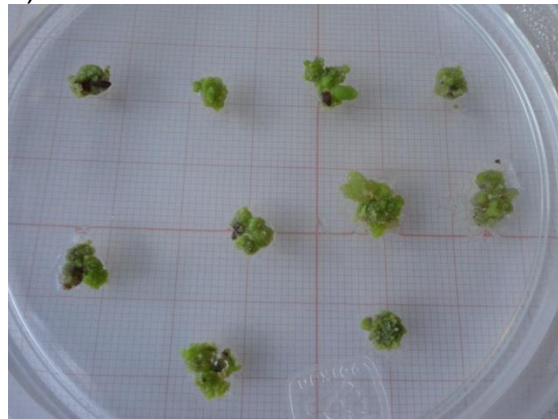
c)



d)



e)



f)

Figura 4. Proliferación de las masas embriogénicas en el medio MSM. a) y b) Línea embriogénica LEL 61-4. c) y d) Línea embriogénica LEL PUE-6. e) y f) Línea embriogénica LEL B-3. Observándose menos embriones y mayor necrosis en esta última línea embriogénica.

En general algunas de las anomalías que se presentaron durante esta fase de multiplicación fueron: la aparición de embriones fusionados, embriones con desarrollo precoz de raíz y deformaciones en los cotiledones (muy ramificados, único cotiledón y ausencia de ellos) (Figura 5). En algunos casos en los embriones somáticos primarios también se observó la producción de callo y el necrosamiento del explante, siendo más notable en la LEL B-3.

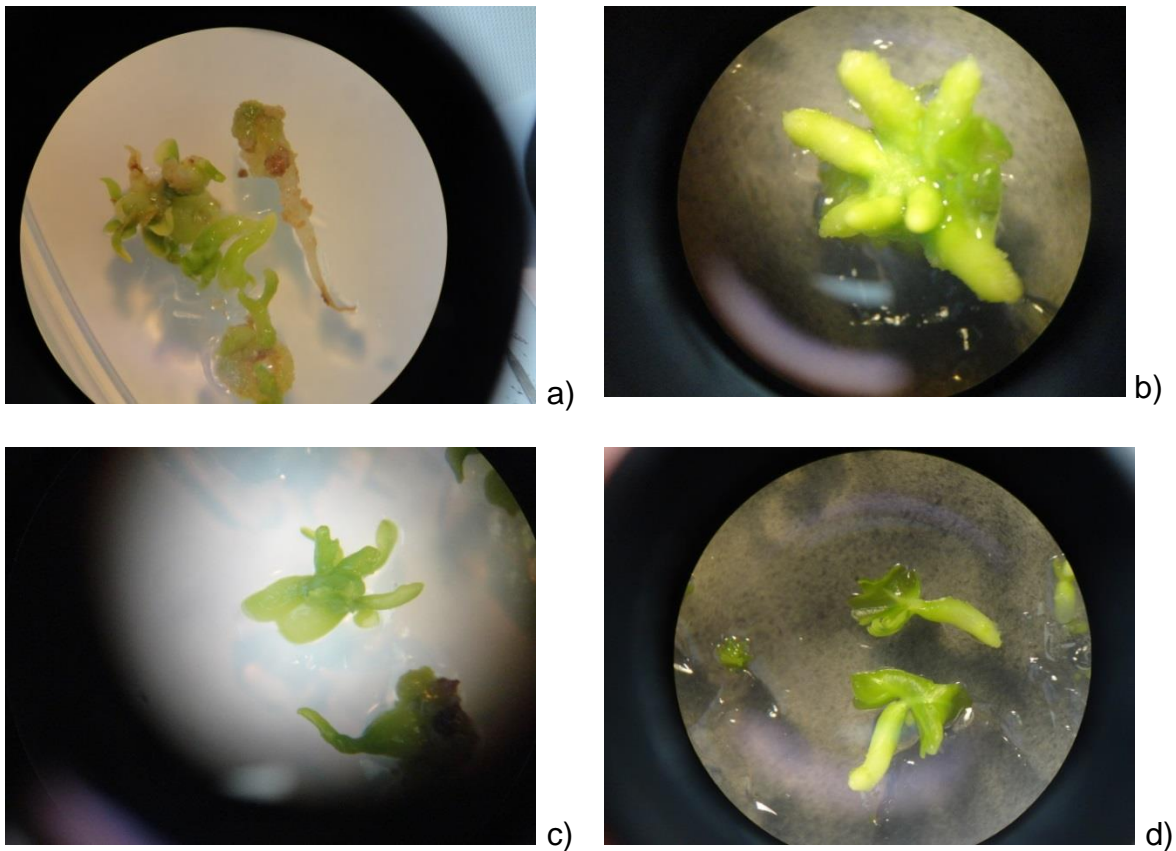


Figura 5. Embriones con deformaciones en los medios de multiplicación. a) Embrión deforme con la radícula. b) Grupo de embriones fusionados en etapa torpedo. c) Embrión con cotiledones prominentes ondulados. d) Embrión con un solo cotiledón.

Cuadro 1. Efecto de la adición del carbón activo en los medios de cultivo sobre la multiplicación de tres líneas embriogénicas de linaloe, datos obtenidos a las 4 semanas de cultivo. M50: MS con los macronutrientes al 50 % MM: Sales modificadas del MS, CA: carbón activo.

Medio	Número de embriones somáticos por etapa				
	Globo	Corazón	Torpedo	Cotiledonar	Total
M50	22.4±1.1 b	3.1±0.4 a	3.7±0.5 a	6.1±0.8 a	23.9±1.3 b
M50 con CA	23.4±1.7 ab	3.5±0.4 a	3.8±0.5 a	6.4±0.6 a	27.6±1.7 ab
MM	19.3±0.9 b	4.4±0.5 a	4.4±0.7 a	6.8±0.7 a	24.5±1.0 b
MM con CA	27.2±1.5 a	4.3±0.5 a	4.2±0.5 a	6.5±0.7 a	32.1±1.5 a
F-valor	6.4	1.9	0.3	0.2	8.3
Pr>F	0.0003	0.1361	0.7967	0.9221	<.0001
Línea embriogénica					
61-4	24.9±1.4 a	3.3±0.5 b	4.1±0.37 a	6.1±0.5 ab	29.3±1.3 a
PUE-6	21.7±1.0 a	4.7±0.4 a	3.6±0.4 a	7.7±0.7 a	27.8±1.1 a
B-3	22.7±1.2 a	3.7±0.4 ab	4.6±0.7 a	4.8±0.5 b	23.9±1.1 b
F-valor	2.2	3.5	1.0	5.3	6.3
Pr>F	0.1162	0.0363	0.3826	0.0053	0.002

Los valores son medias de 2 réplicas de 360 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 2. Efecto de la adición del carbón activo en los medios de cultivo sobre la coloración de los embriones somáticos de tres líneas embriogénicas de linaloe durante su multiplicación, datos obtenidos a las 4 semanas de cultivo. M50: MS con los macronutrientes al 50 % MM: Sales modificadas del MS, CA: carbón activo.

Medio	Color de las masas embriogénicas (explante)		
	Verde (%) (verde 140A)	Verde claro (%) (Amarillo-verde 149B)	Necrótico (%) (Marrón 200A)
M50	54.6±7.7 c	11.8±4.3 a	25.0±6.3 a
MM	67.1±6.0 bc	10.4±3.9 a	13.4±4.9 b
M50 con CA	77.4±4.4 ab	7.4±4.0 a	5.7±2.7 b
MM con CA	84.3±3.3 a	2.9±2.0 a	3.7±2.5 b
F-valor	9.1	1.2	12.0
Pr>F	<.0001	0.3077	<.0001
Línea embriogénica			
LEL 61-4	86.9±1.4 a	3.1±1.4 a	0±0 c
LEL PUE-6	71.2±4.4 b	10.3±3.5 a	10.7±3.2 b
LEL B-3	54.5±6.5 c	11.0±4.0 a	25.1±5.2 a
F-valor	19.1	2.0	27.4
Pr>F	<.0001	0.1422	<.0001

Los valores son medias de 2 réplicas de 360 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Los datos expresados fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arccos X^{1/2}$. Las medias de los valores porcentuales pertenecen a las de sus valores transformados.

Los primeros cambios notables en el tejido empezaron entre la tercera y la cuarta semana de cultivo, apareciendo los nuevos embriones somáticos en las diferentes etapas de desarrollo, incluyendo embriones en etapa cotiledonar, Corredoira *et al.* (2003) indica que los embriones de *Castanea sativa Mill.* también empiezan a multiplicar en dichas semanas observando embriones en las diferentes etapas.

En el caso de la multiplicación de embriones somáticos de *L. anceps ssp. dawsonii*, alcanzó la mayor tasa de multiplicación haciendo subcultivos cada 45 días (Lee *et al.*, 2010). En linaloe el material vegetal multiplicó bien durante la tercera y cuarta semana de cultivo y después de 45 días empezó a deteriorarse, notándose el necrosamiento del mismo. Sin embargo, alguna similitud con lo observado por Lee *et al.* (2010) fue que las masas pro embriogénicas de coloración verde intenso, generaron embriones somáticos en mayor número y vigor, los cuales normalmente desarrollaron sus primeras hojas y raíces sin necesidad de realizar subcultivos en medio fresco. En *Bursera linanoe* la coloración verde en las masas fue la que produjo los embriones con mejor desarrollo y con mayor facilidad para separarlos.

En la inducción de embriones somáticos de material adulto de *Quercus robur* L. también se observaron embriones anómalos como: cotiledones fusionados, cotiledones múltiples o ausencia de ellos (Corredoira *et al.*, 2006). Por otro lado, Yang *et al.* (2012) reportan anomalías en los cotiledones durante la multiplicación de embriones somáticos de fresno de montaña (*Sorbus*

pohuashanensis), así como variación en la coloración de los embriones (embriones de color blanco o amarillo claro y algunos de color verde).

El desarrollo asincrónico de embriones somáticos de *Solanum tuberosum* cv. *Jyothi* presentó una amplia gama de tamaños y estructuras embriogénicas dentro del callo (JayaSree *et al.*, 2001). Esta característica también fue observada durante el cultivo de las masas embriogénicas de *Bursera linanoe*.

Sánchez-Romero *et al.* (2005) indican que la proliferación de los embriones somáticos de *Persea americana* Mill. fue dependiente del genotipo, lo que coincide con las líneas embriogénicas de linaloe, donde la LEL B-3 siempre demostró un menor desarrollo que LEL 61-4 y LEL PUE-6. En adición en la familia *Arecaceae* también se ha observado la influencia del genotipo, sobre la respuesta embriogénica en diferentes especies, por ejemplo en pejibaye, coco, palma dátitera y palma aceitera (Viñas y Jiménez, 2011). En plátano se indica que hay variación en la producción de callo embriogénico, dependiendo del cultivar (Aguilar *et al.*, 2008) de igual manera, en castaño (*Castanea dentata*) se menciona que hay un importante efecto del genotipo en la proliferación de embriones secundarios (Corredoira *et al.*, 2003).

Los medios que adicionados con carbón activo, fueron los que mostraron mejores resultados, se sabe que el establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, especialmente leñosas, está limitado por la ocurrencia de oscurecimientos en los explantes y en el medio de cultivo. Sin embargo, no todos los exudados liberados al medio de cultivo son inhibitorios o

tóxicos, pero en la mayoría de los casos el crecimiento del explante es inhibido, perdiendo gradualmente su capacidad de proliferación hasta su muerte (Azofeifa, 2009).

Las estrategias para evitar los procesos de oxidación que conllevan al oscurecimiento de los tejidos del explante son muchas, entre ellas podemos mencionar el uso del medio líquido, cambio del agente gelificante, subcultivos frecuentes, poda del tejido necrosado, uso de carbón activo, nitrato de plata, polivinil pirrolidona y polivinil polipirrolidona, entre otras. El uso del carbón activo tiene un efecto benéfico debido a su capacidad para remover sustancias inhibitoras o tóxicas del medio de cultivo, que son producidas durante el autoclavado del medio o liberadas por el explante y evita o disminuye la posibilidad de su deterioro (Azofeifa, 2009). Sin embargo, durante el desarrollo de la línea LEL B-3, el problema de necrosamiento siguió presente, aun cuando se adicionó el CA, lo que llevó a analizar la producción de etileno y CO₂ durante la multiplicación de embriones secundarios en las tres líneas embriogénicas, los resultados se exponen en el siguiente apartado.

A pesar del problema de necrosis los cultivos embriogénicos se han mantenido por subcultivos sucesivos por casi cinco años, utilizando como fuente de carbono a la sacarosa al 3 %. Las líneas embriogénicas de *Castanea sativa* y *Castanea crenata*, se han mantenido por subcultivos sucesivos por más de 12 años y la producción de embriones somáticos en etapa de cotiledón no ha disminuido, estas líneas embriogénicas han sido descritas por Vieitez (1995) y Vieitez y Merkle (2005). Por otro lado, durante el mantenimiento de estas líneas

embriogénicas, se han evaluado diferentes tipos y concentraciones de hidratos de carbono y ha resultado que la sacarosa al 3 % ha sido superior que la fructosa, glucosa y la maltosa (Corredoira *et al.*, 2005).

Con los resultados obtenidos en la multiplicación y mantenimiento de las masas proembriogénicas, se determinó utilizar el medio de cultivo MS modificado y nombrado MM con la adición de carbón activo, como el más idóneo para la multiplicación del callo embriogénico de las tres líneas embriogénicas de linaloe. Y podemos confirmar que la línea LEL-B3 fue la que mostró menor productividad de las tres y con menor calidad, debido principalmente al problema de necrosis que presenta.

5.1.2 Producción de etileno y CO₂ durante la multiplicación de las líneas embriogénicas

La producción de etileno y el CO₂ fueron cuantificados en las tres líneas embriogénicas (LEL 61-4, LEL PUE-6 y LEL B-3), en medio de multiplicación durante seis semanas, con la finalidad de conocer si la concentración de etileno está relacionada con la necrosis observada en la línea LEL B-3, durante la segunda y tercera semana de cultivo.

Los resultados indican que aunque no existió diferencia en los niveles de etileno producidos en las tres líneas embriogénicas, si se observa que LEL B-3 presentó altas concentraciones del gas durante un tiempo más prolongado, alrededor de una semana más que las otras dos líneas restantes, quienes

después de la segunda semana disminuyeron los niveles del gas, hasta llegar a un mínimo hacia el final del ciclo de cultivo (Figura 7). Este lapso de tiempo con mayor concentración de etileno en espacio libre del recipiente de cultivo, ocasionó que los tejidos alcanzaran con mayor rapidez la senescencia y provocar el deterioro del material en menor tiempo. Se ha reportado que la sensibilidad al etileno depende del tiempo de exposición, estado de desarrollo del tejido y la especie entre otros (Abeles *et al.*, 1992), por lo que la presencia de mayor concentración de etileno en el espacio de cabeza del frasco ocasionó que los tejidos alcanzaran con mayor rapidez la senescencia y provocaran el deterioro del material más rápidamente (Figura 6).

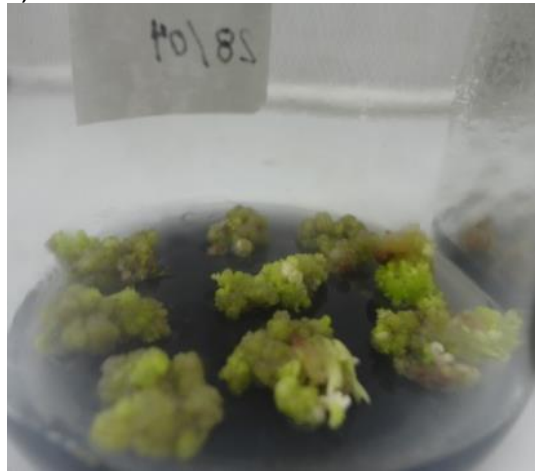
Sin embargo la concentración acumulada de CO₂ en la atmosfera del recipiente, mostró para todas las líneas que los niveles más altos fueron registrados al inicio del cultivo, en la semana dos, para después descender en forma paulatina en las líneas LEL PUE-6 y LEL B-3 y drásticamente en la línea LEL 61-4 (Figura 8). Indicando que este comportamiento puede estar asociado con el metabolismo del CO₂ ya que, esta línea siempre mostró mayor proliferación y desarrollo de los embriones formados.



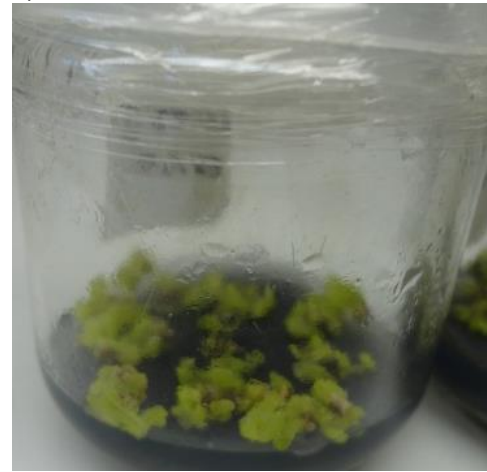
a)



b)



c)



d)

Figura 6. Masas embriogénicas durante seis semanas de cultivo. a) Toma de las muestras. b) LEL B-3. c) LEL 61-4. d) LEL PUE-6.

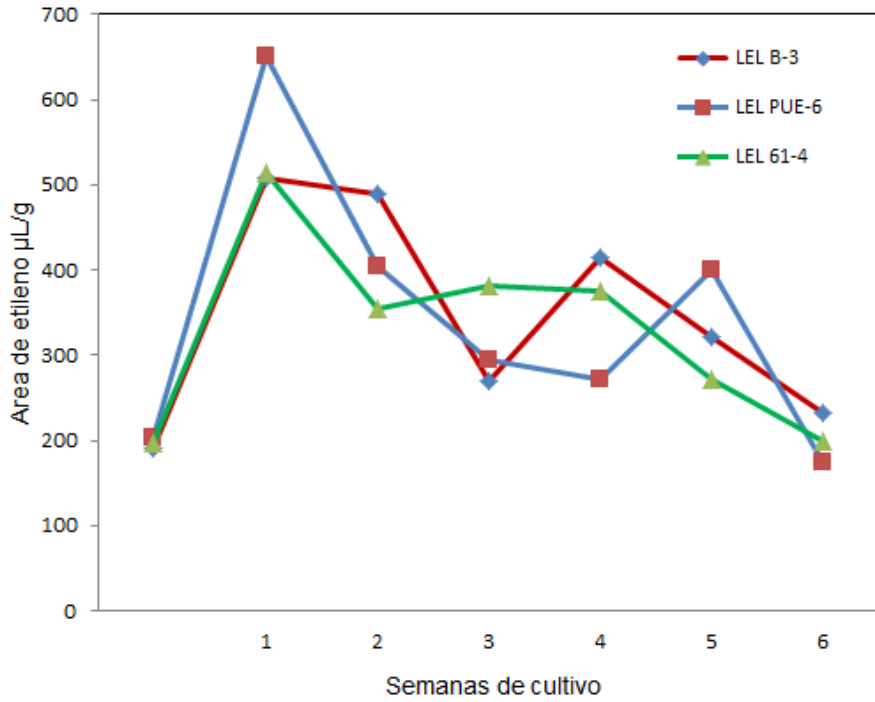


Figura 7. Concentración de etileno ($\mu\text{L/g}$ de tejido) en el espacio de cabeza de recipientes con medio de cultivo y tres líneas embriogénicas.

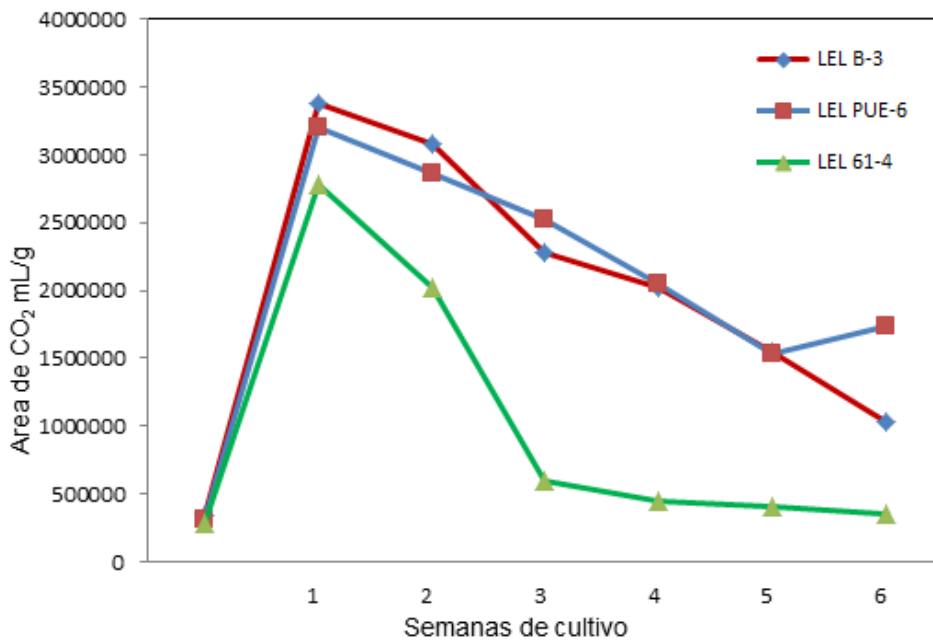


Figura 8. Concentración de CO_2 (mL g^{-1} de tejido) en el espacio de cabeza de recipientes con medios de cultivo y tres líneas embriogénicas.

5.2 Maduración de embriones somáticos

Después de la etapa de multiplicación, los embriones somáticos se sometieron a la aplicación de distintos tratamientos para su maduración. En todos los experimentos se emplearon embriones somáticos individualizados en etapa torpedo aproximadamente de 5 mm de longitud, de color verde intenso (Figura 9).

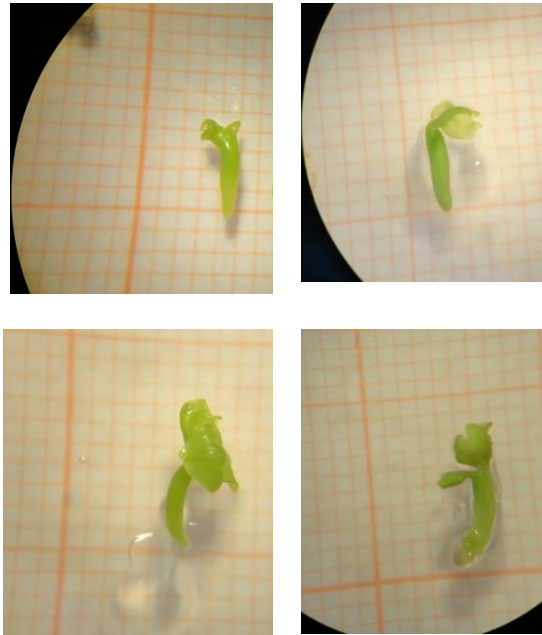


Figura 9. Embriones somáticos de aproximadamente 5 mm de longitud antes de los tratamientos de maduración.

5.2.1 Efecto de la sacarosa en la maduración de embriones somáticos

En este experimento se evaluaron diferentes concentraciones de sacarosa (3%, 4%, 6% y 8%) en la maduración de los embriones somáticos de las tres líneas embriogénicas (LEL 61-4, LEL PUE-6 y LEL B-3). Después de cuatro semanas de cultivo en el medio de maduración, los embriones somáticos tuvieron diferencias morfológicas cuando crecieron en las concentraciones de 3, 4 y 6 % de sacarosa. En el Cuadro 3, se puede observar que con 3 % de sacarosa se obtuvo que el (55.5 %) de los embriones elongaron y este porcentaje disminuyó con forme se incrementó el porcentaje de sacarosa en el medio (el 52.8 % con 4 % y el 46.9 % de embriones elongados con 6 %). Por otro lado, el porcentaje de embriones que desarrollaron cotiledones y raíz fueron estadísticamente diferentes entre estas concentraciones de sacarosa e indica que la mejor concentración fue la de 3 % que consiguió 65.9 % de embriones con cotiledones y el 57.9 % con raíz.

Concentraciones de sacarosa del 3 y 4 % promovieron la coloración del embrión somático de verde translúcido a verde opaco, aunque el tamaño de los cotiledones fueron estadísticamente iguales entre las dos concentraciones, se observó que en ambas concentraciones, hubo embriones con cotiledones pequeños (1-3 mm de longitud) con apariencia clorótica y otros mostraron mayor desarrollo de los cotiledones entre (5-7 mm de longitud) y con una coloración verde intensa.

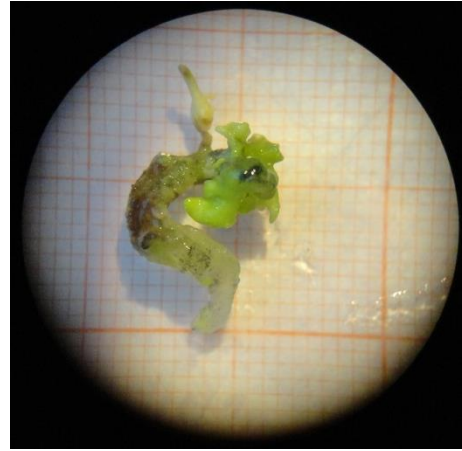
En estas concentraciones (3 y 4 %) los embriones presentaron algunas anomalías como fue el desarrollo de embriones secundarios, esto es el

crecimiento de más embriones somáticos sobre el embrión principal (Figura 10 y 11). En algunos otros casos se observaron estructuras nodulares blanco traslucido, combinadas con un callo amorfo. Los resultados indican que hubo diferencias estadísticas para los porcentajes de embriones con formación de embriogénesis secundaria y que el porcentaje disminuye conforme aumentó la concentración de sacarosa en el medio. El desarrollo de estas estructuras no es conveniente en la etapa de maduración, ya que en la mayoría de los casos se provoca la deformación del embrión principal, debido a que existe fusión de los tejidos y esto impide que el embrión principal se desarrolle de forma normal y completa.

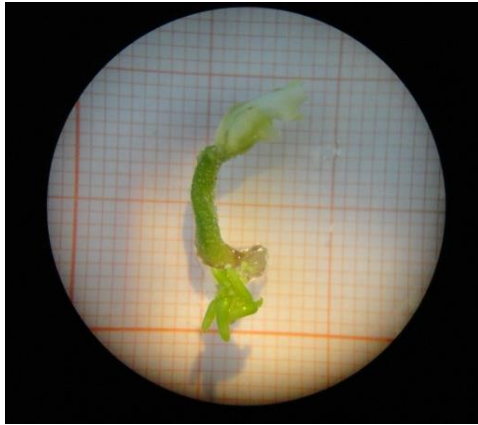
En cuanto a la longitud de la raíz, condición que se toma en cuenta para comprobar la maduración, se observó que hubo diferencias estadísticas entre las diferentes concentraciones y en sacarosa al 4 % se formaron las raíces con mayor longitud (5.7 mm) en algunos casos llegaron a medir hasta 15 mm de longitud. En esta concentración también se obtuvo el mayor porcentaje (41.1 %) de embriones con raíz ≥ 5 mm (Cuadro 4), el cual fue estadísticamente diferente ($p \leq 0.0086$) con el resto de las concentraciones.



a)



b)



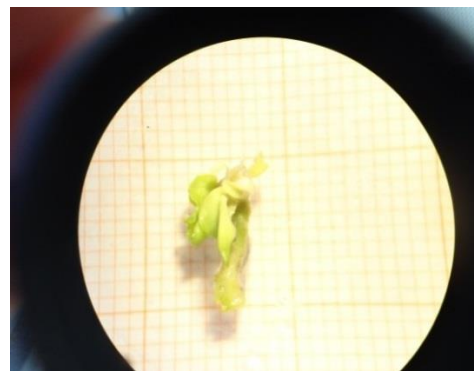
c)



d)



e)



f)

Figura 10. Embriones somáticos tratados con sacarosa 3 %. a) Embrión con crecimiento de raíces sin desarrollo de ápice de LEL 61-4. b). LEL PUE-6 c) Embrión con embriones secundarios. d) Embrión con necrosis de LEL B-3 e) Embrión con cotiledones pequeños. f) Embrión con callo.

El porcentaje de embriones maduros se obtuvo de acuerdo al total de embriones que elongaron, emitieron raíz y desarrollaron cotiledones. Los resultados indican que el mayor porcentaje de embriones madurados se logró con sacarosa al 4 % con (42.3 %), seguido de sacarosa 3 y 6 % (38.5 y 36.9 respectivamente) (Cuadro 3). Además con sacarosa 4 % se registró el 8.8 % de embriones que emitieron el brote apical, esto es que hubo conversión a plántula (Figura 12 y Cuadro 4).

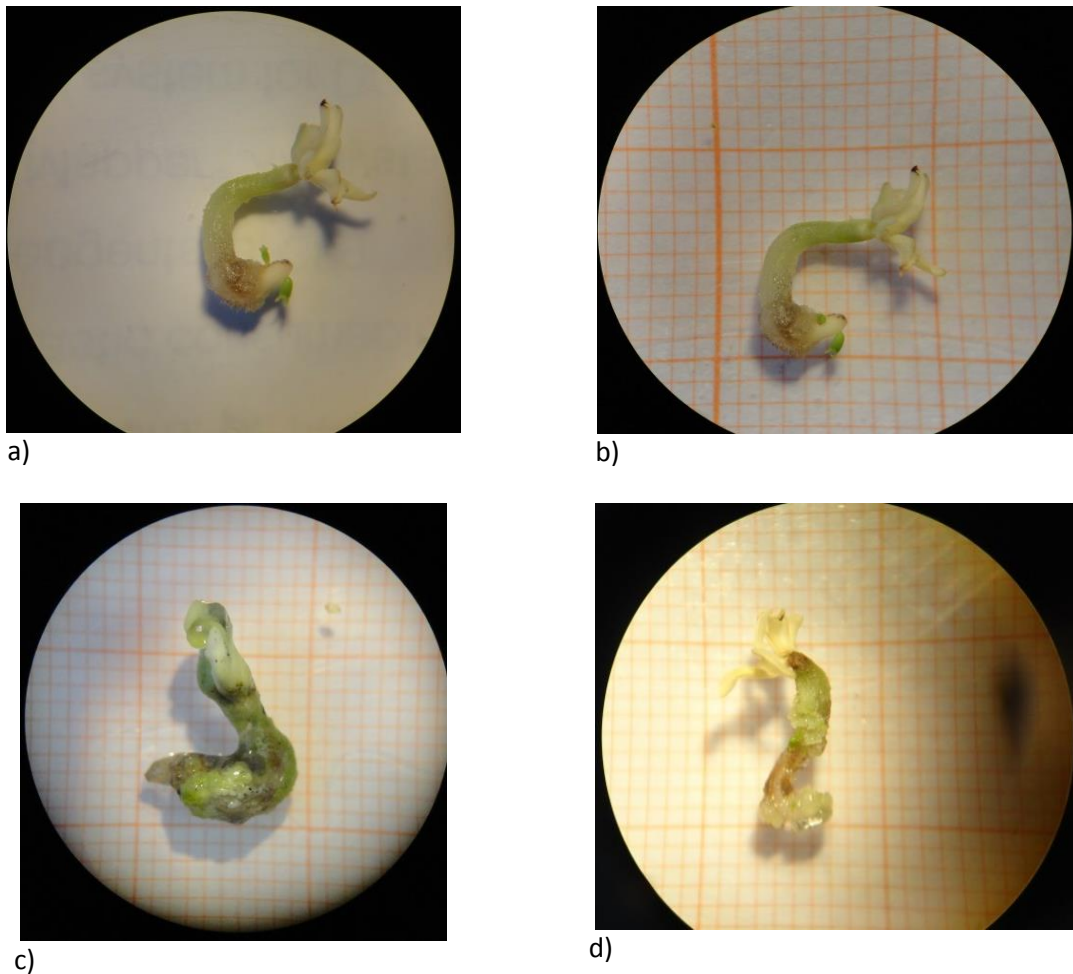
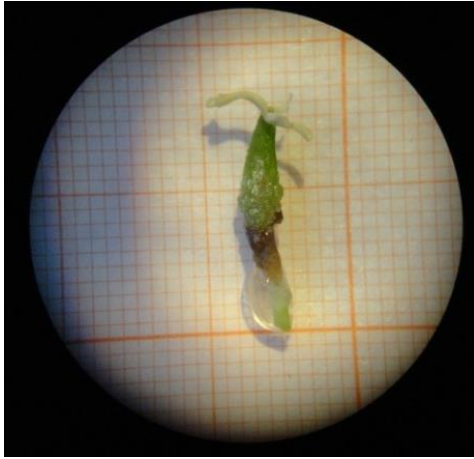
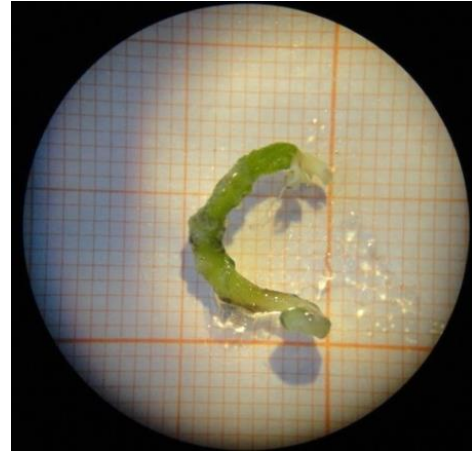


Figura 11. Embriones somáticos tratados con sacarosa 4% de dos líneas embriogénicas. a) y b) embrión donde se aprecia el crecimiento de dos embriones secundarios en la LEL 61-4. c) embrión deforme de LEL B-3 y d) embrión con crecimiento de callo amorfo de LEL B-3.



a)



b)



c)



d)

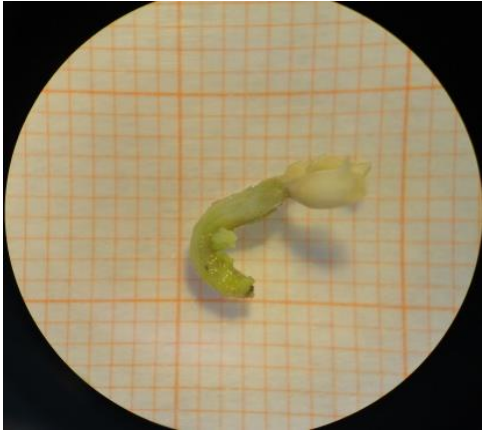


e)

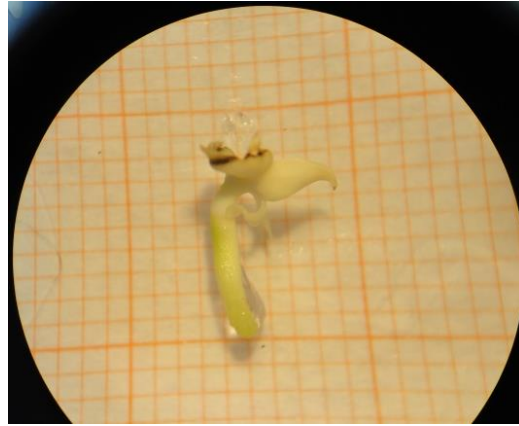
Figura 12. Embriones somáticos tratados con sacarosa 4% de la LEL PUE-6. a) y b) embriones poco desarrollados c) y d) embrión somático donde se observa el desarrollo del primer par de foliolos y emergencia de la raíz. e) embrión somático que desarrollo hojas.

Lo anterior demuestra que altas concentraciones de sacarosa (6 y 8 %) disminuyen la aparición de embriones secundarios (26.3 y 4.4 %) y el callo con 19.8 y 13.0 % respectivamente, mientras que los porcentajes mayores se encontraron en las concentraciones 3 y 4 % de sacarosa (Cuadro 4). Lo cual indica que altas concentraciones del azúcar, ejercen mayor potencial osmótico al medio, haciéndolo mucho más negativo, lo que se traduce en una disminución del crecimiento y desarrollo del embrión, notándose una apariencia clorótica seguido de una necrosis generalizada, llevando a los embriones a la muerte después de seis semanas de cultivo (Figura 13 y 14).

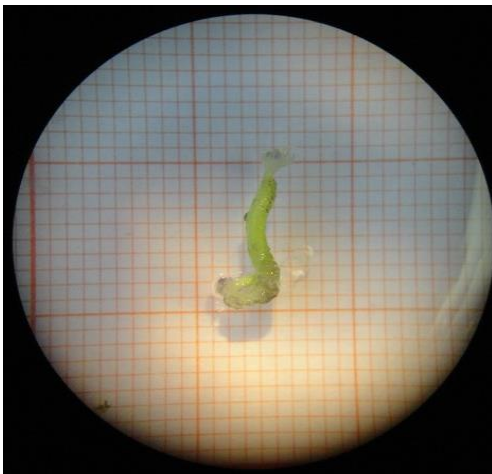
Con relación a la capacidad que tienen las diferentes líneas embriogénicas evaluadas, se puede decir que se encontraron diferencias estadísticas ($p \leq 0.0124$) para la variable porcentaje de embriones con emisión de raíz, con los valores más altos para las líneas LEL 61-4 y LEL PUE-6 con (57.4 y 41.7 % respectivamente). No hubo diferencias entre las líneas en cuanto al porcentaje de maduración, sin embargo, la línea embriogénica LEL B-3 que tuvo el porcentaje más bajo en la multiplicación, también registró el porcentaje más bajo en la maduración de los embriones (19.3 %) (Cuadro 3).



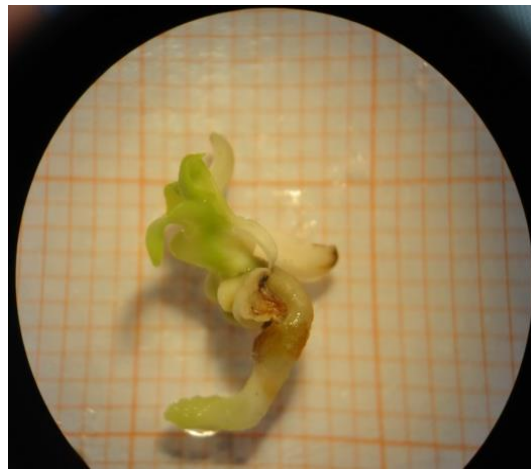
a)



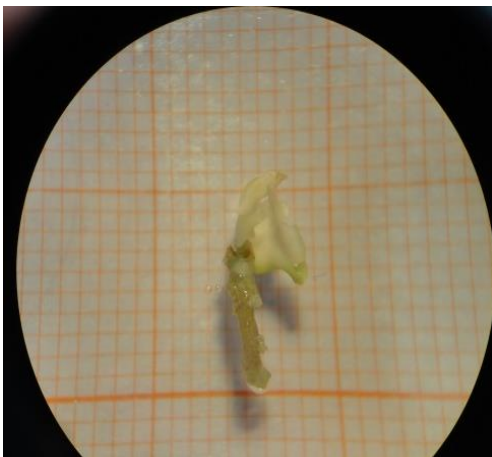
b)



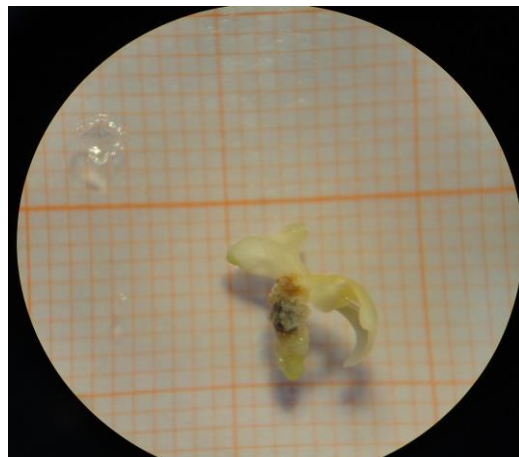
c)



d)



e)

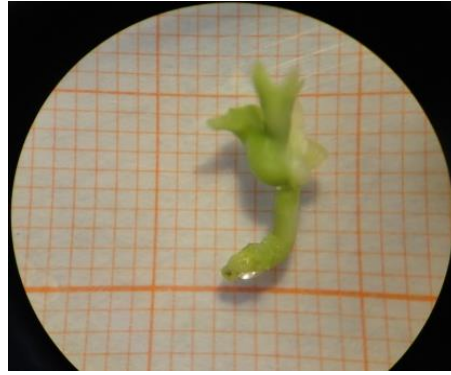


f)

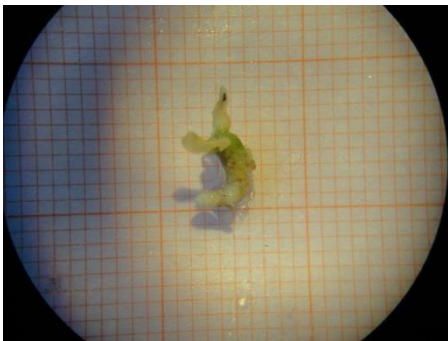
Figura 13. Embriones tratados con sacarosa 6 % poco desarrollados con apariencia clorótica de las tres líneas embriogénicas. a) y b) LEL 61-4. c) y d) LEL PUE-6). e) y f) LEL B3.



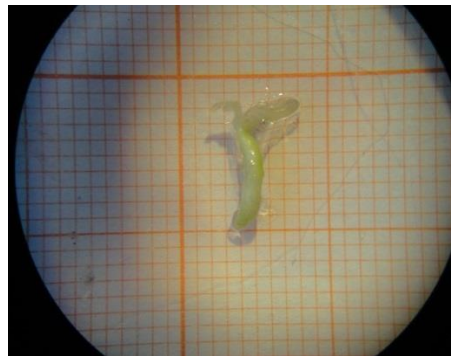
a)



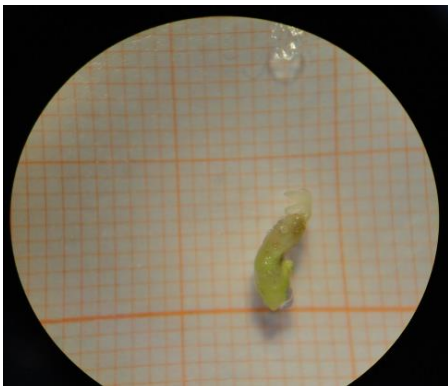
b)



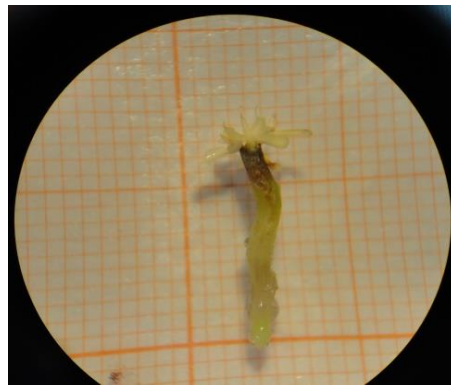
c)



d)



e)



f)

Figura 14. Embriones tratados con sacarosa 8 % poco desarrollados con apariencia clorótica de las tres líneas. a) y b) LEL 61-4. c) y d) LEL PUE-6. e) y f) LEL B-3.

Cuadro 3. Efecto de la sacarosa en el desarrollo y maduración de embriones somáticos de tres líneas embriogénicas de linaloe a los 30 días de cultivo.

Tratamiento	Longitud (mm)			Porcentaje de embriones			
	Embrión	Cotiledones	Radícula	Elongados	Con cotiledones	Con raíz	Maduros
Sacarosa 3 %	11.2±0.8 a	3.9±0.3 a	3.7±0.5 ab	55.5±14.0 a	65.9±7.9 a	57.9±10.8 a	38.5±8.0 a
Sacarosa 4 %	11.7±1.0 a	4.6±0.6 a	5.7±0.8 a	52.8±10.6 a	57.5±7.2 ab	46.5±9.64 ab	42.3±8.4 a
Sacarosa 6 %	10.9±0.6 a	3.6±0.2 a	4.6±0.6 ab	46.9±5.1 a	66.1±9.5 a	45.0±5.2 ab	36.9±3.7 a
Sacarosa 8 %	9.1±0.6 a	3.0±0.3 a	2.7±0.5 b	21.93±7.3 a	27.9±10.6 b	15.0±9.7 b	6.5±6.5 b
F-Valor	2.1	2.1	2.5	2.1	4.0	5.9	5.5
Pr>F	0.0985	0.1075	0.0683	0.1550	0.0334	0.0101	0.0128
Clon							
LEL 61-4	11.0±0.5 a	3.9±0.5 a	4.6±0.5 a	54.5±7.0 a	59.1±7.7 a	57.4±10.0 a	38.6±5.9 a
LEL PUE- 6	11.5±0.7 a	3.3±0.2 a	4.1±0.6 a	46.28±7.5 a	55.6±9.0 a	41.7±6.6 ab	35.2±7.9 a
LEL B-3	10.1±0.7 a	4.5±0.4 a	4.4±0.8 a	32.2±11.8 a	48.3±11.2 a	24.2±7.8 b	19.3±8.0 a
F-Valor	2.5	1.7	0.4	1.5	0.5	6.4	2.9
Pr>F	0.0867	0.1638	0.6576	0.2602	0.6175	0.0124	0.0956

Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Los datos expresados en porcentaje fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arccos X^{1/2}$. Las medias de los valores porcentuales pertenecen a las de sus valores transformados.

Cuadro 4. Efecto de la sacarosa en el desarrollo de embriones somáticos de tres líneas embriogénicas de linaloe a los 30 días de cultivo.

Tratamiento	Embriones con raíz \geq .5 mm (%)	Embriones con brote apical (%)	Supervivencia (%)	Embriones con con secundaria (%)	Embriones con callo (%)
Sacarosa 3 %	19.8 \pm 6.6 ab	0 \pm 0 a	62.3 \pm 12.9 a	63.6 \pm 5.8 a	21.9 \pm 7.3 a
Sacarosa 4 %	41.1 \pm 4.9 a	8.8 \pm 5.6 a	68.2 \pm 7.9 a	41.0 \pm 3.7 b	15.4 \pm 7.1 a
Sacarosa 6 %	11.0 \pm 7.1 b	0 \pm 0 a	47.3 \pm 15.0 a	26.3 \pm 5.8 b	19.8 \pm 6.6 a
Sacarosa 8 %	4.4 \pm 4.4 b	0 \pm 0 a	23.5 \pm 10.6 a	4.4 \pm 4.4 c	13.0 \pm 8.3 a
F-Valor	6.2	2.0	1.8	30.6	0.3
Pr>F	0.0086	0.1678	0.2047	<0.0001	0.8432
Línea embriogénica					
LEL 61-4	26.0 \pm 8.4 a	3.3 \pm 3.3 a	57.7 \pm 11.6 a	30.7 \pm 7.9 a	19.8 \pm 6.0 a
LEL PUE- 6	19.8 \pm 6.1 a	3.3 \pm 3.3 a	48.0 \pm 12.7 a	37.2 \pm 10.7 a	11.5 \pm 5.8 a
LEL B-3	11.5 \pm 5.8 a	0 \pm 0 a	45.3 \pm 11.1 a	33.6 \pm 8.6 a	21.3 \pm 6.5 a
F-Valor	1.7	0.5	0.2	0.7	0.6
Pr>F	0.2256	0.6186	0.7809	0.5182	0.5546

Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Los datos expresados en porcentaje fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arccos X^{1/2}$. Las medias de los valores porcentuales pertenecen a las de sus valores transformados.

5.2.2 Efecto de la maltosa en la maduración de embriones somáticos

Después de cuatro semanas en el medio de maduración se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.0015$) en la longitud de los embriones, con los valores más altos para maltosa al 3 % con 12.7 mm y al 4 % (15 mm), los embriones cambiaron el color de su apariencia de verde traslucido a verde opaco. De igual manera las longitudes de los cotiledones fueron mayores (3.6 y 4.4 mm) respectivamente en estas concentraciones. La longitud de la raíz fue superior en los embriones tratados con maltosa 4 % (7.2 mm).

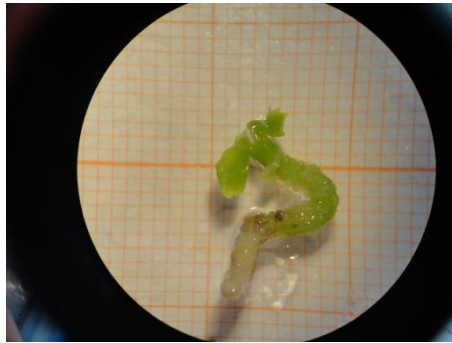
La maltosa al 4 % fue el mejor tratamiento para la maduración de los embriones registrando los valores más altos en longitudes tanto del embrión como de cotiledones y raíz, alcanzado hasta 40 mm de tamaño y algunos con raíz de 20 y 30 mm de longitud.

Con respecto a los porcentajes de embriones elongados, los valores más altos se encontraron con maltosa 3 % (70.2) y maltosa 4 % (72.3). Mientras que, el porcentaje de embriones que emitieron cotiledones o raíz no fueron afectados por los niveles de maltosa en el medio. Por otro lado, se encontraron diferencias ($p \leq 0.001$) para el porcentaje de embriones con raíz ≥ 5 mm (germinación), en donde maltosa 3 y 4 % fueron los que consiguieron los mejores valores (36.9 y 62.1 % respectivamente, mientras que con la concentración de 6 % se obtuvo el 19 % y ningún embrión con la concentración más alta de maltosa (Cuadro 6) (Figuras 15 y 17).

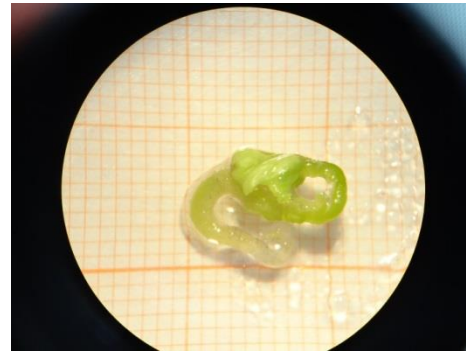
Aunque en el porcentaje de embriones maduros no se encontraron diferencias estadísticas entre las concentraciones de maltosa, si se observa que concentraciones menores de maltosa obtienen mayores porcentajes de embriones maduros con un promedio de 61.7 %. Aunado a que en estas concentraciones también se registraron embriones que emitieron el brote apical, es decir que se obtuvieron plantas completas (conversión) (Cuadro 6) (Figura 15).

Con respecto al desarrollo del brote apical se observaron embriones que desarrollaron una protuberancia en esta área como si se fueran a desarrollar los primordios foliares, sin que sucediese, característica observada en embriones tratados en las concentraciones 4 y 6 % (Figura 19).

Los resultados indican que altas concentraciones (6 y 8 %) tanto con sacarosa como con maltosa, no propiciaron el buen desarrollo de los embriones somáticos, ni tampoco contribuyeron a la maduración de los clones probados. Debido a las características que presentaron los embriones (apariencia clorótica y menor desarrollo tanto de cotiledones como de radícula) con ambas fuentes de carbono (Figuras 16 y 18). Cuando estos embriones fueron cambiados a un medio fresco y disminuyendo la concentración de la fuente de carbono al 3 %, tampoco se notó recuperación terminaron por morir después de una semana del cambio.



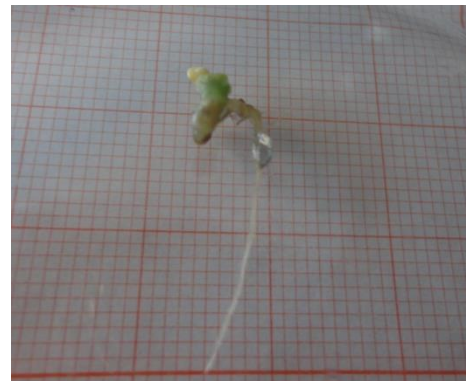
a)



b)



c)



d)

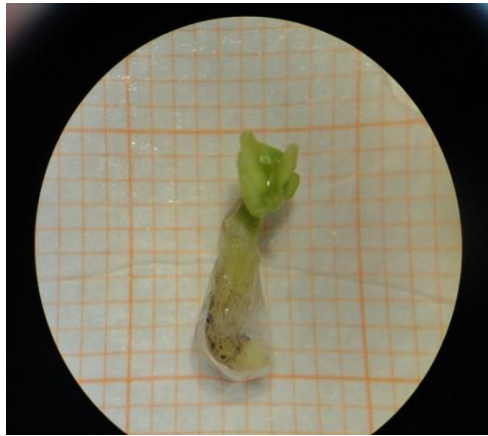


e)

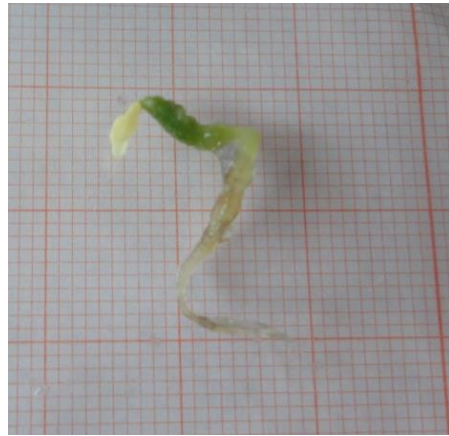


f)

Figura 15. Embriones tratados con 3 y 4 % de maltosa de la LEL 61-4. a) y b) embriones somáticos tratados con maltosa 3 %. c), d), e) y f) embriones somáticos tratados con maltosa 4 % en la imagen c y e) embriones con desarrollo de hojas.



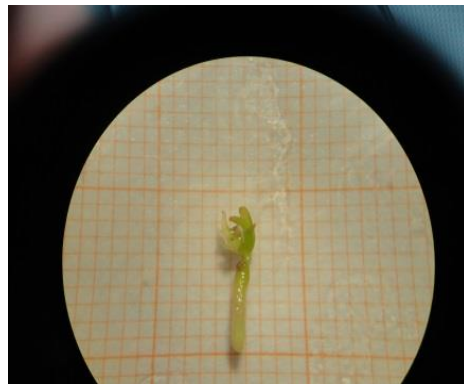
a)



b)



c)

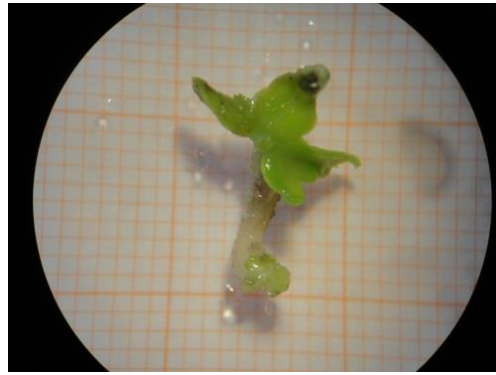


d)

Figura 16. Embriones somáticos tratados con 6 y 8 % de maltosa de la LEL 61-4. a) y b) Embriones somáticos tratados con maltosa 6 %. c) y d) Embriones somáticos tratados con maltosa 8 %.



a)



b)

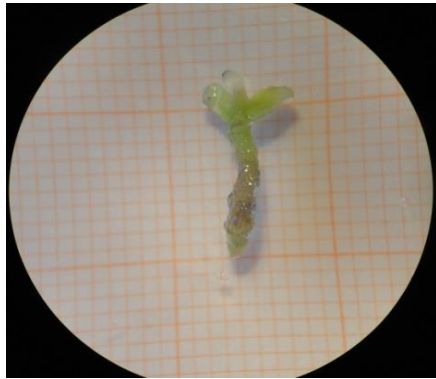


c)



d)

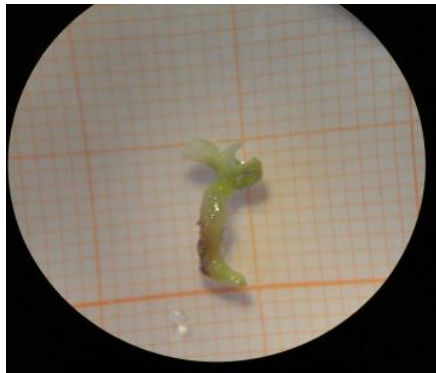
Figura 17. Embriones somáticos tratados con maltosa 3 y 4 % de la LEL PUE-6. a) y b) Embriones somáticos tratados con maltosa 3 % de la LEL PUE-6. c) y d) Embriones somáticos tratados con maltosa 4 % LEL PUE-6.



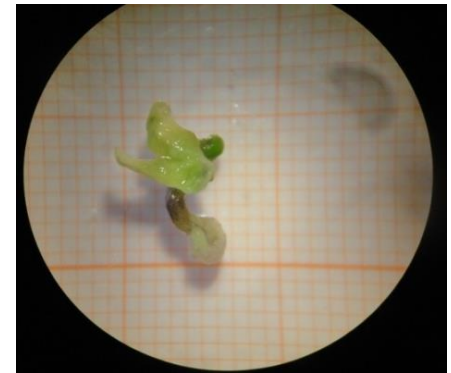
a)



b)

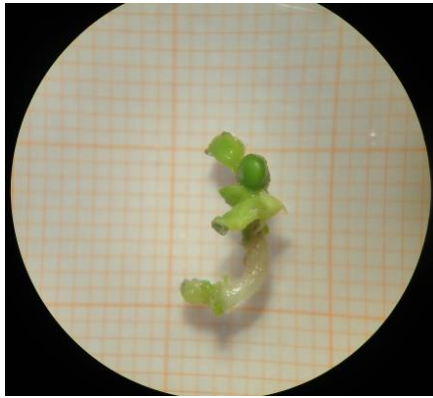


c)

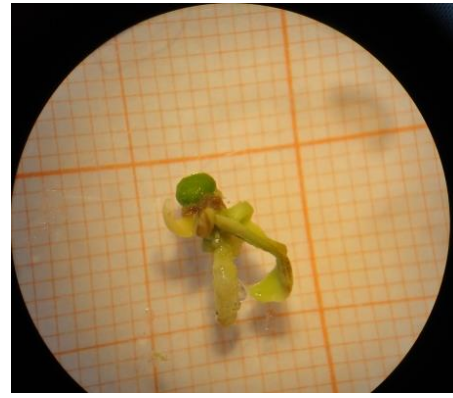


d)

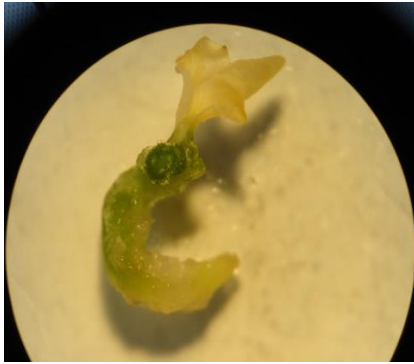
Figura 18. Embriones somáticos tratados con maltosa 6 y 8 % de la LEL PUE-6. a) y b) Embriones somáticos tratados con maltosa 6 % de la LEL PUE-6. c) y d) Embriones somáticos tratados con maltosa 8 % LEL PUE-6.



a)



b)



c)

Figura 19. Embriones con problema de desarrollo de apice (formacion de una protuberancia con apariencia de posible brotación de hojas).a) Embrión tratado con maltosa 4 % de la LEL PUE-6, b) embrión tratado con Maltosa 6 % de la LEL PUE-6, c) embrión tratado con maltosa 6 % de la LEL 61-4.

No se encontraron diferencias estadísticas en el porcentaje de callo formado en los embriones. De las cuatro concentraciones mencionadas, maltosa 3 % es la que presentó mayor porcentaje de embriones somáticos con embriogénesis secundaria, pero en general estos porcentajes son más bajos a los encontrados en los tratamientos con sacarosa (Cuadro 6). Lo que indica que la maltosa ejerce mayor potencial osmótico en el medio que la sacarosa, lo que hace que disminuya considerablemente el problema de embriogénesis secundaria. Por otro lado, los embriones presentaron mayor longitud con respecto a los tratamientos con sacarosa principalmente con las concentraciones 3 y 4 %.

Cuadro 5. Efecto de la maltosa en el desarrollo y maduración de embriones somáticos de dos líneas embriogénicas de linaloe a los 30 días de cultivo.

Tratamiento	Longitud (mm)			Porcentaje de embriones			
	Embrión	Cotiledones	Raíz	Elongados	Con cotiledones	Con raíz	Maduros
Maltosa 3 %	12.7±0.8 ab	3.6±0.2 ab	4.2±0.5 ab	70.2±6.6 a	70.6±10.3 a	76.71±5.94 a	57.5±13.6 a
Maltosa 4 %	15.0±1.5 a	4.4±0.3 a	7.2±1.3 a	72.3±5.6 a	79.0±1.2 a	79.0±1.2 a	66.1±8.4 a
Maltosa 6 %	11.2±0.8 b	3.3±0.2 b	5.0±1.0ab	59.8±7.8 ab	75.00±10.6 a	51.3±8.7 a	36.7±6.6 a
Maltosa 8 %	9.5±0.5 b	2.8±0.2 b	3.0±0.5 b	45.0±5.2 b	76.9±8.3 a	51.5±14.8 a	34.4±9.0 a
F-Valor	5.5	7.8	3.5	4.45	0.1	4.0	2.8
Pr>F	0.0015	0.0001	0.0192	0.0187	0.3603	0.0265	0.8744
Clon							
LEL 61-4	12.3±0.6 a	3.3±0.1 b	4.6±0.5 a	60.8±4.7 a	72.2±5.8 a	71.3±5.1 a	48.1±6.0 a
LEL PUE- 6	11.7±0.9 a	4.0±0.3 a	6.5±1.1 a	63.9±6.4 a	81.8±5.5 a	51.3±11.2 b	49.8±11.1 a
F-Valor	0.3	8.2	1.0	0.2	0.9	6.0	0.03
Pr>F	0.5681	< .0001	0.0225	0.1172	0.3603	0.0265	0.8744

Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Los datos expresados en porcentaje fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arccos X^{1/2}$. Las medias de los valores porcentuales pertenecen a las de sus valores transformados.

Cuadro 6. Efecto de la maltosa en el desarrollo de embriones somáticos de dos líneas embriogénicas de linaloe a los 30 días de cultivo.

Tratamiento	Embriones con raíz \geq 5 mm (%)	Embriones con brote apical (%)	Supervivencia (%)	Embriones con secundaria (%)	Embriones con callo (%)
Maltosa 3 %	36.9 \pm 3.7 ab	8.8 \pm 5.6 a	90.0 \pm 0 a	30.4 \pm 7.1 a	8.8 \pm 5.6 a
Maltosa 4 %	62.1 \pm 9.5 a	17.5 \pm 8.0 a	90.0 \pm 0 a	17.5 \pm 8.0 a	8.8 \pm 5.6 a
Maltosa 6 %	19.4 \pm 9.2 bc	0 \pm 0 a	90.0 \pm 0 a	8.8 \pm 5.6 a	8.8 \pm 5.6 a
Maltosa 8 %	0 \pm 0 c	0 \pm 0 a	85.56 \pm 4.4 a	4.4 \pm 4.4 a	4.4 \pm 4.4 a
F-Valor	13.6	2.4	1.3	2.6	0.1
Pr>F	0.0001	0.1058	0.2985	0.0872	0.9294
Clon					
LEL 61-4	27.5 \pm 6.5 a	5.8 \pm 3.1 a	90.0 \pm 0 a	15.5 \pm 4.8 a	6.6.5 \pm 2.3 a
LEL PUE- 6	33.7 \pm 11.8 a	8.2 \pm 5.5 a	86.7 \pm 3.3 a	14.9 \pm 5.8 a	10.0 \pm 4.9 a
F-Valor	0.7	0.2	2.7	0.01	0.3
Pr>F	0.4262	0.6751	0.1220	0.9327	0.5937

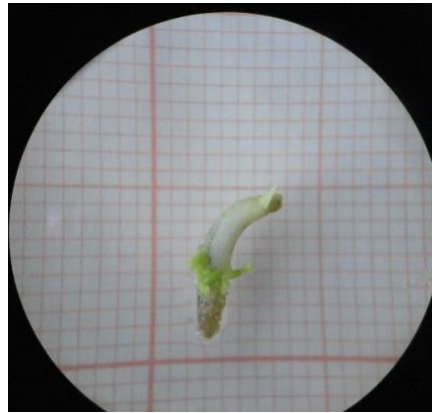
Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Los datos expresados fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arccos X^{1/2}$. Las medias de los valores porcentuales pertenecen a las de sus valores transformados.

5.2.3 Efecto del ácido abscísico (ABA) y polietilenglicol (PEG) en la maduración de embriones somáticos

El objetivo de este experimento fue comprobar el efecto del ABA y PEG en la maduración de embriones somáticos de la línea embriogénica LEL 61-4.

Trascurridas las cuatro semanas de cultivo de los embriones en el medio de maduración con ABA y PEG, solo se observó un ligero incremento de tamaño y éste fue inferior al tamaño que se consiguió con los tratamientos de sacarosa y maltosa. Los porcentajes de embriones elongados fueron bajos y no se encontró diferencia entre tratamientos. En ambas concentraciones tanto de ABA y PEG los embriones no mostraron buen desarrollo (Figuras 20 y 21). Estos desarrollaron cotiledones pequeños, encontrándose los de menor longitud en los tratamientos con ABA. En el caso del desarrollo de la raíz, solo se presentó un bajo porcentaje en los embriones tratados con PEG 8000 al 5 %, siendo este tratamiento el único que presento embriones maduros (3.3 %) (Cuadro 7).

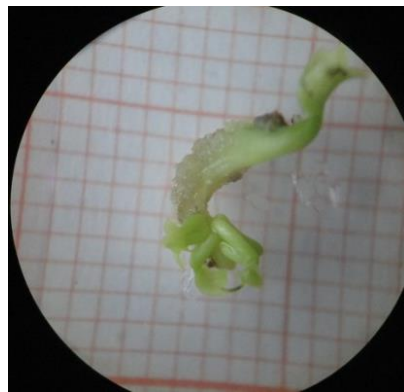
La mayoría de los embriones mostraron una apariencia clorótica y con desarrollo de callo. Se encontró diferencia estadística ($p \leq 0.001$) para la variable porcentaje de embriones que desarrollaron embriogénesis secundaria. Estos porcentajes fueron mayores en los tratamientos con ABA 3.78 μM (57) y 7.67 μM (50), porcentajes más altos que aquellos que presentaron los tratamientos con sacarosa (4, 6 y 8 %) y maltosa (3, 4, 6 y 8 %) (Cuadro 8).



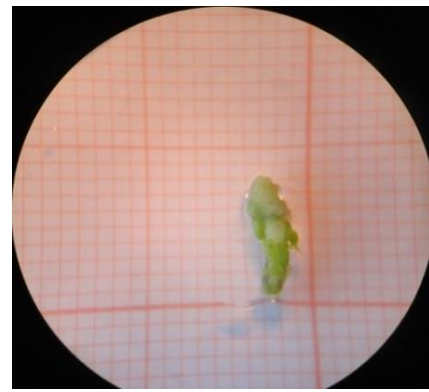
a)



b)

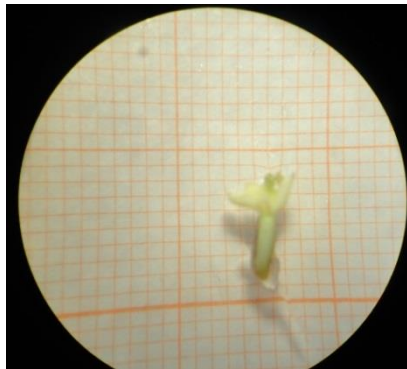


c)

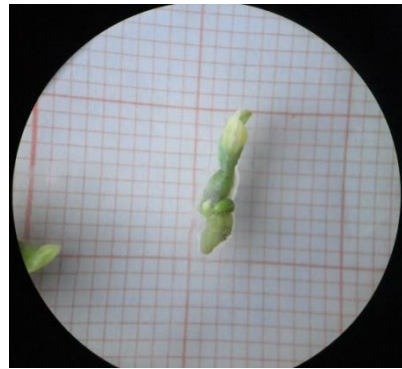


d)

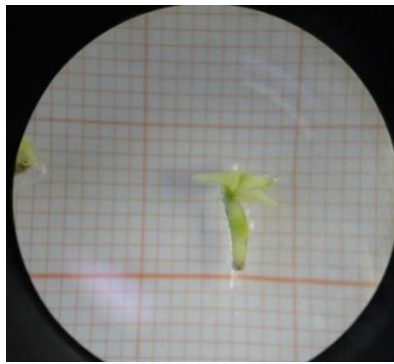
Figura 20. Embriones somáticos tratados con ABA. a) y b) embriones somáticos tratados con 3 μM de ABA de la LEL 61-4. c) y d) embriones somáticos tratados con 7 μM de ABA LEL 61-4.



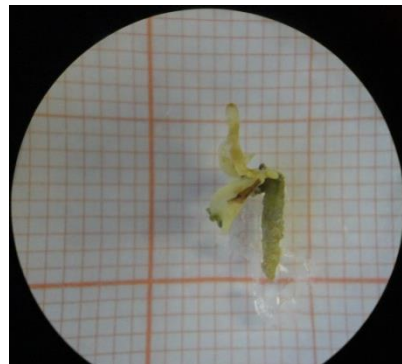
b)



a)



c)



d)

Figura 21. Embriones somáticos tratados con PEG. a) y b) embriones somáticos tratados con PEG 5 % de la LEL 61-4. c) y d) embriones somáticos tratados con PEG 6 % LEL 61-4.

Cuadro 7. Efecto del ABA y PEG en el desarrollo y maduración de embriones somáticos de la línea embriogénica LEL 61-4 de linaloe a los 30 días de cultivo.

Tratamiento	Longitud (mm)			Porcentaje de embriones			
	Embrión	Cotiledones	Raíz	Elongados	Con cotiledones	Con raíz	Maduros
ABA 3.78 µM	8.5±0.4 a	2.0±0.2 b	.	37.1±6.1 a	37.4±3.6 b	0 a	0 a
ABA 7.57 µM	7.3±0.2 a	1.9±0.1 b	.	19.8±6.1 a	40.4±3.5 b	0 a	0 a
PEG 8000 5 %	7.6±0.4 a	3.0±0.3 a	3	24.4±8.2 a	65.5±6.1 a	3.3±3.3	3.3±3.3 a
PEG 8000 6 %	7.6±0.3 a	2.6±0.2 ab	.	27.8±5.1 a	54.1±4.5 ab	0 a	0 a
F-Valor	1.9	5.5	.	1.3	8.0	1.0	1.0
Pr>F	0.1257	0.0014	.	0.2976	0.0005	0.4074	0.4074

Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Los datos expresados fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$. Las medias de los valores porcentuales pertenecen a las de sus valores transformados.

Cuadro 8. Efecto del ABA y PEG en el desarrollo de embriones somáticos de la LEL 61-4 de linaloe a los 30 días de cultivo.

Tratamiento	Embriones con secundaria (%)	Embriones con callo (%)	Supervivencia (%)
ABA 3.78 μM	57.1 \pm 2.4 a	31.16 \pm 4.9 a	90.0 \pm 0 a
ABA 7.57 μM	50.9 \pm 4.0 a	29.14 \pm 7.9 a	86.7 \pm 3.3 a
PEG 8000 5 %	18.2 \pm 5.5 b	21.3 \pm 6.5 a	90.0 \pm 0 a
PEG 8000 6 %	6.6 \pm 4.3 b	31.0 \pm 5.4 a	83.3 \pm 4.3 a
F-Valor	33.9	0.5	1.3
Pr>F	<.0001	0.6541	0.2780

Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Los datos expresados fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$. Las medias de los valores porcentuales pertenecen a las de sus valores transformados.

Cabe mencionar que estos experimentos de maduración, se realizaron en placas de Petri, colocando en posición horizontal a los embriones, lo que provocó que hubiera mayor superficie de contacto con el medio de cultivo. A diferencia de los experimentos anteriores con sacarosa y maltosa, en que los embriones fueron colocados en posición vertical y uno por tubo de ensaye. Esta diferencia de posición y contacto pudo influir en la mayor inducción y crecimiento de embriones secundarios, ya que en los experimentos de maduración con niveles de sacarosa y maltosa, únicamente el área de la radícula estuvo en contacto con el medio de cultivo.

Los resultados anteriores indican que los niveles evaluados de ABA y PEG no favorecen la maduración del embrión somático en la línea LEL 61-4. Pero los porcentajes de embriogénesis secundaria que presento el ABA revelan que puede ser un regulador a probar en la multiplicación y mantenimiento de los embriones somáticos, ya que además en general los porcentajes de supervivencia fueron altos.

JayaSree *et al.* (2001) mencionan que la transición de embriones de forma globular a cotiledonar es un punto crítico en la embriogénesis, ya que los reguladores de crecimiento pueden tener múltiples efectos en el proceso, y es dependiente de la concentración endógena o de la concentración exógena al momento de aplicarse en los diferentes estadios en que se encuentran las estructuras embrionarias. Carrier *et al.* (1997) indican que en embriones somáticos y cigóticos extirpados del gametofito de *Picea glauca* y *Engelmannii complex*, mostraron un buen desarrollo cuando son cultivados en medio adicionado con sacarosa a diferencia de aquellos cultivados sin ésta. Además, los embriones cigóticos mostraron un crecimiento atrofiado y una apariencia necrótica, concluyen que los lípidos de reserva en los embriones cigóticos no fueron suficientes para el crecimiento y desarrollo de los mismos.

En *Bursera linanoe* la adición de 40 g L⁻¹ de sacarosa, fue el tratamiento en el que se obtuvo el mejor resultado en la maduración de embriones somáticos. En la etapa cotiledonar de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King, se evaluaron de forma similar estas concentraciones de sacarosa durante la maduración y desarrollo. La mejor concentración la consiguieron con la sacarosa

al 6 %, con base al número de embriones que permanecieron vivos y lograron germinar. Mientras que, la sacarosa al 8 % mostró menor desarrollo de igual forma que en linaloe, aunque en ambas especies esta concentración también contribuyó a que disminuyera la producción de embriogénesis secundaria (Collado *et al.*, 2007). Resultados similares se encontraron en *Sorbus pohuashanensis* (fresno de montaña) al evaluar concentraciones del 2 al 6 % de sacarosa, en embriones somáticos que se encontraban en la etapa de torpedo y se consideraron como embriones maduros a aquéllos que desarrollaron cotiledones y radícula. La concentración de sacarosa al 5 % resultó significativamente ($p < 0.01$) superior a las demás (Yang *et al.*, 2012). Sin embargo, Robichaud *et al.* (2004) trabajando con embriones somáticos de *Castanea dentata* indican que los tratamientos con sacarosa de 3 al 7.5 %, no produjeron cambios notables en el tamaño del embrión, pero si se observaron algunas anormalidades, tales como embriones somáticos con un solo cotiledón, o con más de 2 cotiledones, además embriogénesis secundaria y/o la producción de callo sobre ellos. Encontraron además que hubo un comportamiento diferencial entre genotipos. Estas mismas anomalías, como ya se han mencionado se encuentran también en linaloe.

Por otro lado, Witjaksono y Litz. (1999) evaluaron la maduración de embriones somáticos en aguacate (*Persea americana* Mill.) mediante el número de embriones que cambiaron de apariencia, de blanca translúcida a opaca y el número de embriones en etapa cotiledonar. Estos autores probaron diferentes concentraciones con sacarosa (1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13 %) y encontraron que el mayor número de embriones opacos estuvo en la concentración con 9 % de sacarosa. Sin embargo, en esta concentración alta hubo menor desarrollo de los

embriones y fue la sacarosa al 3 % en la que se obtuvo mayor desarrollo de cotiledones. Cabe mencionar, que en nuestra especie ocurrió lo mismo, ya que se observó que las altas concentraciones de azúcares, ya sea sacarosa o maltosa provocaron en los embriones somáticos un cambio de coloración y el desarrollo disminuyó conforme se usaron concentraciones más altas (8 %), con ambas fuentes de carbono.

En cuanto a la coloración de los embriones somáticos, ésta es diferente y depende de las especies, por ejemplo algunas especies como; *Castanea dentata* (Robichaud *et al.*, 2004), *Sorbus pohuashanensis* (Yang *et al.*, 2012), *Persea americana* Mill. (Witjaksono y Litz., 1999), *Swietenia macrophylla* King (Collado *et al.*, 2007), *Castanea sativa* Mill. (Corredoira *et al.*, 2003), *Cocos nucifera* L. (Azpeitia *et al.*, 2003), *Cocos nucifera* L. (Montero-Cortés *et al.*, 2010), los embriones presentan un color blanco durante las etapas primarias de desarrollo, adquiriendo coloración verde hasta que se desarrollan en una planta completa. Mientras que en otras especies como: *Solanum tuberosum* L. (Sánchez-Enciso *et al.*, 2005), *Laelia anceps* ssp. *Dawsonii* (Lee *et al.*, 2010), *Solanum tuberosum* cv *Jyothi* (JayaSree *et al.*, 2001) y *Bursera linanoe* el embrión somático es de color verde desde la primera etapa (globular).

La longitud del embrión somático es otro parámetro que ha sido utilizado como un indicador de la maduración de embriones somáticos (Corredoira *et al.*, 2003). En *Castanea sativa* Mill. el uso de sacarosa y maltosa al 3 %, fue la concentración donde se registró embriones de mayor tamaño, mientras que en *Bursera linanoe* la concentración de 4 % tanto de sacarosa como de maltosa fue la

mejor en conseguir la mayor longitud de los embriones, aunque con maltosa se obtuvieron embriones de mejor calidad.

Por otro lado, el uso de PEG para la maduración de embriones ha sido reportado y al respecto Lipavská *et al.* (2000) indican que 3.75 % de PEG proporciono un adecuado potencial osmótico que acelero el proceso de maduración en comparación con el tratamiento control y promoviendo la germinación de los embriones, mientras que concentraciones de 7.5 % no fueron favorables para la maduración de embriones somáticos de abeto rojo (*Picea abies* L.). En el caso de castaño (*Castanea dentata*) los tratamientos fueron PEG 6000 (0.0, 50.0, 75.0 y 100 g L⁻¹) el tamaño del embrión disminuyó al aumentar la concentración de PEG y los embriones mostraron una apariencia blanco opaco con un tinte de amarillo, mientras que los embriones control permanecieron con una apariencia translúcida (Robichaud *et al.*, 2004). Otro regulador del crecimiento que se ha estudiado durante la maduración de embriones somáticos de castaño es el ABA, donde los tratamientos utilizados fueron 0.38, 3.78 and 7.57 µM de ABA, para los que no reportaron diferentes en la longitud del embrión, sin embargo, los embriones tratados mostraron una coloración blanco opaco y por el contrario los embriones control, permanecieron con una apariencia translúcida (Robichaud *et al.*, 2004).

Lelu *et al.* (1999) encontraron una diferencia en cuanto a la producción de embriones somáticos en las líneas embriogénicas de dos especies de pinos (*Pinus sylvestris* L. y *Pinus pinaster* Ait.), sin embargo cuando se adicionaron los medios con 60 µM de ABA a medio liquido o semisolido en ambas líneas la adición ayudo al desarrollo de los cotiledones, indicando que el origen de las líneas no afecto la

capacidad para madurar de los embriones. En cocotero (*Cocos nucifera*) se utilizaron diferentes concentraciones de ABA (0, 22.5, 45 y 90 μM) y PEG (0, 15, 30, 60 g L^{-1}) las cuales estimularon la formación de embriones somáticos por callo embriogénico; también observaron mayor número de embriones somáticos tipo torpedo, principalmente en presencia de 90 μM de ABA en combinación con diferentes concentraciones de PEG además permitieron que los callos con embriones mostraran una consistencia más friable, lo que favorece la separación mecánica de los embriones de los callos (Azpeitia *et al.*, 2003). En la misma especie la aplicación de ABA (2.5 y 7.5 μM) mejoro la producción de embriones somáticos (Fernando y Gamage, 2000). Con respecto a linaloe los niveles evaluados de ABA y PEG no favorecieron la maduración del embrión somático, pero de acuerdo a los porcentajes de embriogénesis secundaria que presento el ABA, revelan que puede ser un regulador a probar en la multiplicación y mantenimiento.

En abies (*Abies cephalonica* Loud.) se aplicaron diferentes concentraciones de ABA (4, 8, 16 y 32 IM ABA) solas o en combinación con 5 % de PEG 8000 a masas embriogénicas observándose un efecto positivo en la capacidad de las masas para formar embriones somáticos cotiledonares, sin embargo en este caso parece depender parcialmente de la combinación con otros factores como la línea celular, la concentración y la duración que están expuestas dichas masas al tratamiento (Krajňáková *et al.*, 2008). De igual manera en células en suspensión de picea (*Picea glauca x engelmanni*) que se colocaron en un medio de maduración con 60 μM de ABA y 50 g L^{-1} PEG 4000 se encontró una diferencia entre líneas celulares, aunque después de tres semanas en la mayoría de las

líneas los embriones desarrollaron a la etapa cotiledonar tornándose amarillo (Kong y von Aderkas, 2007).

La aplicación de PEG (5 %, 7.5 %, y 10 %) combinada con ABA (40 mg L⁻¹) a tejido embriogénico dio lugar a la maduración de embriones somáticos de pino (*Pinus taeda* L.) indicando que las mejores concentraciones fueron 5 % y 7.5 % ya que aparentemente 10 % de PEG inhibe el desarrollo de los embriones (Li *et al.*, 1997). Lo mismo se reporta en PEG para la maduración de embriones somáticos de picea (*Picea glauca*), se utilizaron concentraciones de PEG (2.5 %, 5 %, 7.5 %, y 10 %) indicando que 7.5 % de PEG fue la mejor concentración donde los embriones maduros se caracterizaron por tener los cotiledones expandidos y registraron un aumento de tamaño lo cual ocurrió trascurridos 40 días (Stasolla *et al.*, 2003). En contraste con linaloe se registraron bajos porcentajes de embriones que tuvieron un aumento en su tamaño además de presentar una apariencia muy clorótica lo que pudiera indicar que las concentraciones evaluadas de PEG no favorecieron a la maduración de dichos embriones.

5.3 Germinación de embriones somáticos

Los siguientes experimentos se realizaron con el fin de aumentar el porcentaje de conversión de embriones somáticos a plántula. En este caso los embriones somáticos tratados fueron de un centímetro de longitud que se encontraban en etapa cotiledonar de color verde (Figura 22).



Figura 22. Embriones somáticos de aproximadamente 10 mm de longitud antes de los tratamientos de germinación.

5.3.1 Efecto de un brasinoesteroide sobre la germinación de embriones somáticos

Trascurridas las cuatro semanas de cultivo se observó un incremento significativo ($p \leq 0.01192$) en la longitud de los embriones que crecieron con BR 0.002 mg L^{-1} . Aunque no hubo diferencias estadísticas en el porcentaje de embriones con raíz (51 %), si se observó que los mejores valores se obtuvieron

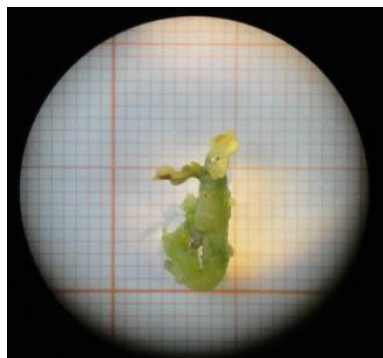
con BR 0.002 mg L⁻¹ y en este tratamiento, se registró una longitud media de raíces de 12 mm e inclusive algunos embriones desarrollaron raicillas secundarias (Figura 23). Además, con esta concentración de BR se registraron porcentajes bajos de embriogénesis secundaria (13.3 %) y formación de callo (6.6 %).

En cuanto a la longitud de los cotiledones, en todos los tratamientos se registró un valor similar. Lamentablemente el tratamiento de BR, no aumentó el porcentaje de embriones que desarrollarán una planta completa, ya que no se observó el desarrollo del meristemo apical en ninguno de los tratamientos, a pesar del buen desarrollo de raíz. Por otra parte en las concentraciones de BR 0.02 y 0.2 mg L⁻¹, la gran mayoría de los embriones presentaron necrosis, lo que provocó menor desarrollo en cuanto a su tamaño y formación de raíz (Figura 24).

Una de las características importantes que se pudo observar en una parte de los embriones evaluados, fue que el domo apical mostró una apariencia plana en lugar de cóncava, lo cual nos puede indicar que se está presentando un problema en el desarrollo de los primordios foliares y que este puede ser a nivel de expresión de genes involucrados en el desarrollo del meristemo apical (Figura 24). Lo anterior puede explicar el bajo porcentaje de embriones que desarrollan a plantas completas. Finalmente el porcentaje de supervivencia oscila entre el 70 y 83.3 % sin que se observen diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 9).

Después de evaluar las tres concentraciones de BR y considerar a 0.002 mg L⁻¹, como la de mejor resultado, se decidió probar con otra fuente de carbono (maltosa) ya que en experimentos anteriores, este azúcar dio los mejores

resultados en cuanto a la formación del brote apical. Se evaluó sacarosa 4 % más la adición de 0.002 de BR y maltosa al 4 % más la adición de 0.002 de BR esta vez se utilizó la línea embriogénica LEL PUE-6 debido a la disponibilidad del material.



a)



b)

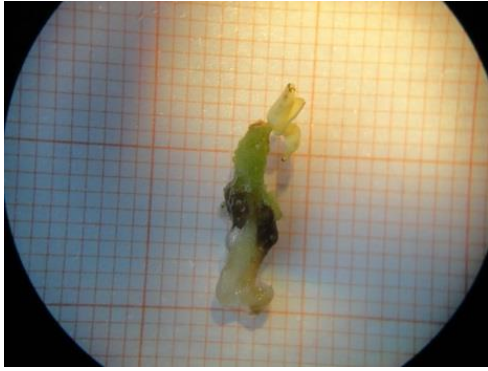


c)

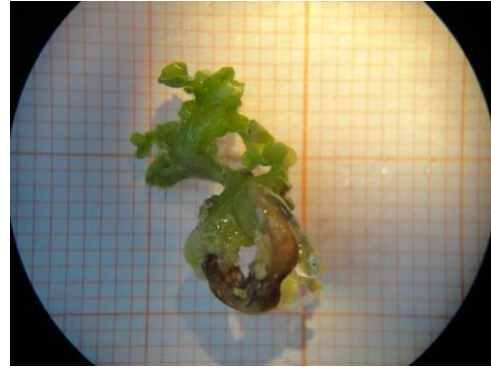


d)

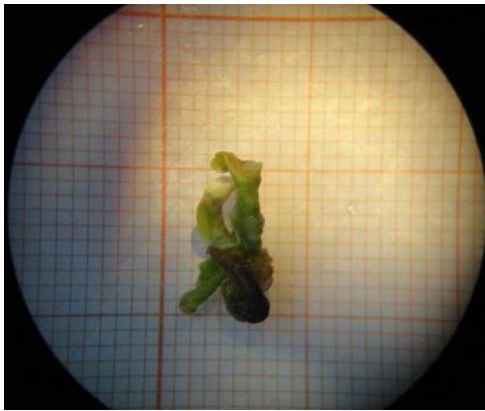
Figura 23. Embriones somáticos tratados con BR de la línea LEL 61-4. a) y b) Embriones sin la aplicación del regulador (Testigo). c) y d) Embriones con BR 0.002.



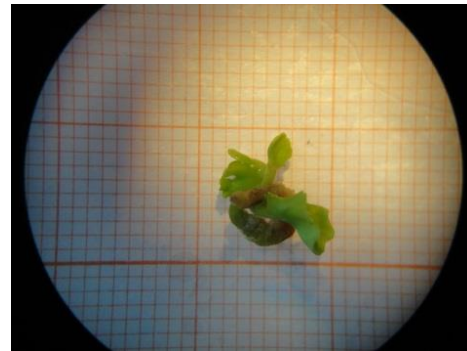
a)



b)



c)



d)



e)

Figura 24. Embriones somáticos tratados con 0.02 y 0.2 BR de la línea LEL 61-4. a) y b) embriones con 0.02 de BR, c) y d) embriones con 0.2 de BR. e) Embrión con el domo apical plano.

Cuadro 9. Efecto del BR en la germinación de embriones somáticos de la LEL 61-4 de linaloe a los 30 días de cultivo.

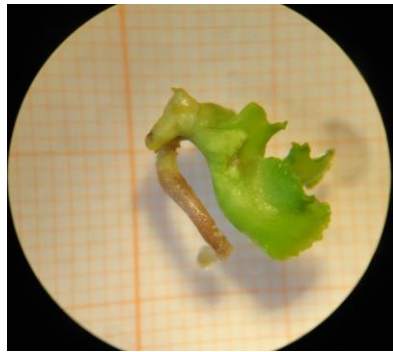
Tratamiento (mg L ⁻¹)	Longitud (mm)			Porcentajes			Supervivencia
	Embrión	Cotiledón	Raíz	Embriones con raíz ≥ 5 mm	Embriones con secundaria	Embriones con callo	
Testigo (BR 0)	15.8±1.4 ab	4.2±0.3 a	7.7±1.5 a	26.2±9.2 a	32.9±3.6 a	35.8±9.2 a	83.3±6.6 a
BR 0.002	22.8±4.0 a	4.1±0.4 a	12.0±3.0 a	51.0±8.7 a	13.3±7.7 a	6.6±6.6 a	76.7±7.7 a
BR 0.02	14.4±0.7 b	4.6±0.4 a	4.1±0.3 a	32.3±13.2 a	26.0±10.4 a	19.3±12.2 a	83.3±6.6 a
BR 0.2	14.1±0.6 b	4.2±0.4 a	6.1±0.9 a	28.5±16.7 a	19.9±6.6 a	13.3±7.7 a	70.1±6.6 a
F-Valor	3.5	0.3	3.4	0.8	1.3	1.8	0.8
Pr>F	0.0192	0.8016	0.0230	0.5027	0.3334	0.1922	0.4948

Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Los datos expresados fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$. Las medias de los valores porcentuales pertenecen a las de sus valores transformados.

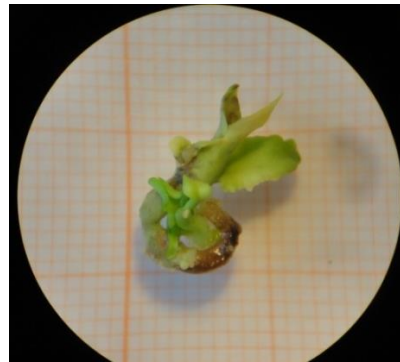
Pasadas las cuatro semanas de cultivo se pudo observar un ligero incremento de tamaño únicamente en los embriones tratados con sacarosa 4 % + BR 0.002 que no superan los valores anteriores (Cuadro 9). En este tratamiento los embriones desarrollaron cotiledones de mayor longitud (5.2 mm). Lo mismo sucedió en la longitud de la raíz, aunque el valor es más alto que con maltosa 4 % + BR 0.002 no iguala a los del primer experimento donde se obtuvo 12 mm de longitud en comparación con 8.5 mm (Cuadro 10) (Figura 25).

El incremento en la fuente de carbono en combinación con el BR, tampoco disminuyó los porcentajes de embriogénesis secundaria y callo, ni contribuyó al desarrollo del brote apical. Por el contrario, se pudo observar una disminución en los porcentajes de supervivencia. Los embriones mostraron una apariencia necrótica y el marchitamiento de cotiledones. También se pudo observar la característica plana del domo meristemático. Una diferencia que se observó en los embriones tratados con maltosa, fue que algunos formaron una protuberancia en esta área como si se fueran a desarrollar los primordios foliares, cosa que no sucedió y esta característica también fue observada en los tratamientos de maduración con maltosa (Figura 26).

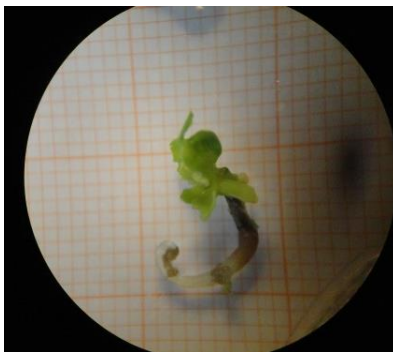
Finalmente los resultados indican que las concentraciones de BR evaluadas, no contribuyeron a la formación del brote apical, sino que únicamente contribuyeron al desarrollo de raíces al utilizarse junto con la sacarosa al 3 %.



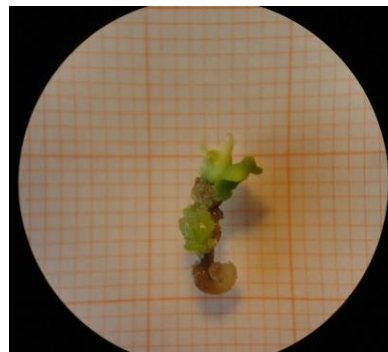
a)



b)

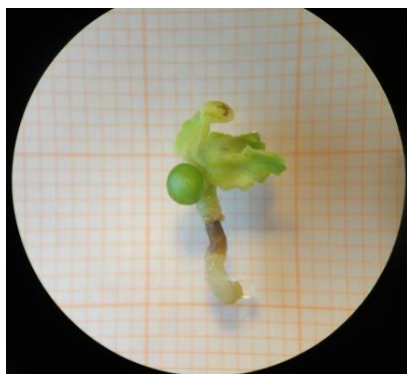


c)

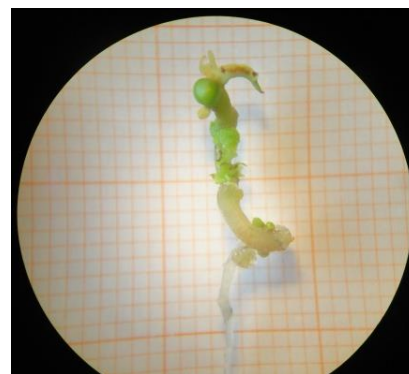


d)

Figura 25. Embriones somáticos tratados con sacarosa 4 % + BR 0.002 de la línea LEL PUE-6. c) y d) embriones somáticos tratados con sacarosa 4 % + BR 0.002 de la LEL PUE-6



a)



b)

Figura 26. Embriones somáticos tratados con maltosa 4 % + BR 0.002 de la LEL PUE-6 con deformación en la parte del ápice.

Cuadro 10. Efecto del BR en combinación con dos fuentes de carbono en la germinación de embriones somáticos de la LEL PUE-6 a los 30 días de cultivo.

Tratamiento	Longitud (mm)			Porcentajes			
	Embrión	Cotiledones	Raíz	Embriones con raíz \geq 5 mm	Embriones con secundaria	Embriones con callo	Supervivencia
Sacarosa 4 % + BR 0.002	15.1 \pm 1.0 a	5.2 \pm 0.4 a	8.5 \pm 2.7 a	22.3 \pm 6.2 a	22.0 \pm 6.6 a	36.1 \pm 7.0 a	57.1 \pm 8.0 a
Maltosa 4% + BR 0.002	11.7 \pm 0.4 b	3.3 \pm 0.2 b	3.1 \pm 0.2 a	6.6 \pm 4.5 a	28.4 \pm 6.9 a	6.6 \pm 4.5 b	65.1 \pm 4.9 a
F-Valor	6.3	10.5	3.2	4.2	0.45	12.5	0.7
Pr>F	0.0147	0.0021	0.0846	0.0548	0.5125	0.0023	0.4087

Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Los datos expresados fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$. Las medias de los valores porcentuales pertenecen a las de sus valores transformados.

5.3.2 Efecto del ácido giberélico y maltosa sobre la germinación de embriones somáticos

Con la finalidad de inducir el crecimiento del brote apical en los embriones somáticos, se evaluaron tres concentraciones de AG₃ (0.001, 0.01 y 0.1 mg L⁻¹) en embriones de la línea LEL PUE-6 en etapa cotiledonar. Trascurridas las cuatro semanas de cultivo se observó que la longitud de los embriones incrementó, pero el aumento no fue significativamente diferente entre los tratamientos. Tampoco hubo diferencias estadísticas en las variables: longitud de raíz y cotiledones. Las medias más altas de longitud de raíz (7.6 mm) y del porcentaje de embriones con raíz ≥ 5 mm (32.2), se encontró en el tratamiento testigo sin AG₃.

Respecto al porcentaje de embriones con embriogénesis secundaria los tratamientos AG₃ 0.01 y 0.1 registraron el valor más alto (51 %). Es notable que aunque no se encontraron diferencias significativas, para la supervivencia de los embriones, los resultados indican que a mayor concentración de AG₃, ésta disminuye ya que el porcentaje más alto se encontró en el testigo sin AG₃ (Cuadro 11) (Figura 27y 28). Además, la mayoría de los embriones tratados con AG₃ se necrosaron y tendieron a curvarse en lugar de tener un crecimiento recto, perdiendo por completo su forma y sin desarrollo del brote apical (Figura 28). Se encuentra también un problema notable en el desarrollo del ápice de los embriones ya que en la mayoría de estos se observa aplanado en lugar de cóncavo con cotiledones ondulados o poco desarrollados.



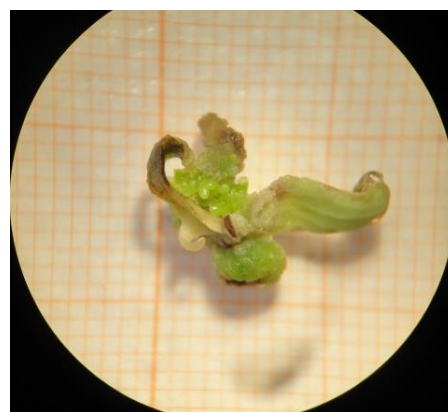
a)



b)

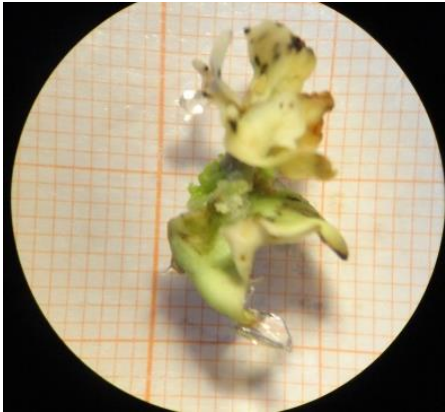


c)

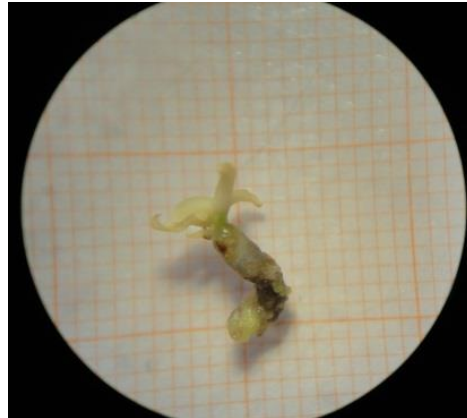


d)

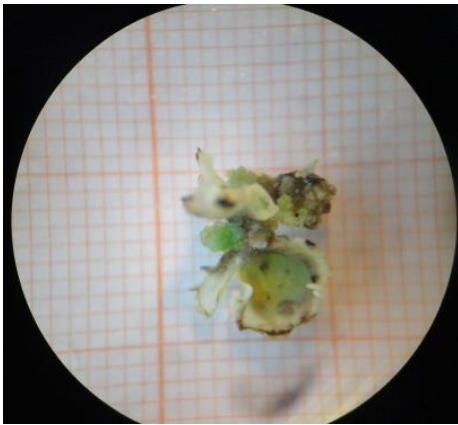
Figura 27. Embriones somáticos tratados con AG_3 (0.001 mg L^{-1}) de la línea LEL PUE-6. a) y b) embriones sin la aplicación del regulador (Testigo), c) y d) embriones con AG_3 (0.001 mg L^{-1}).



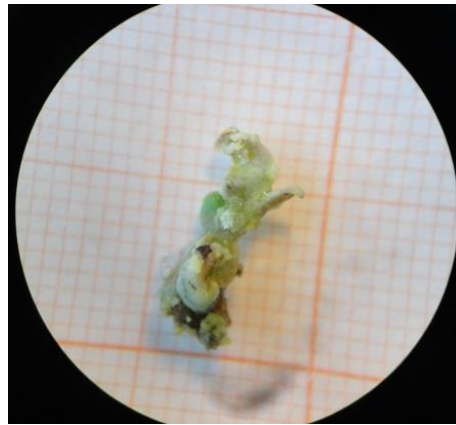
a)



b)



c)



d)

Figura 28. Embriones somáticos tratados con AG_3 (0.01 y 0.1 $mg\ L^{-1}$) de la línea LEL PUE-6. a) y b) embriones con AG_3 (0.01 $mg\ L^{-1}$) c) y d) embriones con AG_3 (0.1 $mg\ L^{-1}$).

Cuadro 11. Efecto del AG₃ en la germinación de embriones somáticos de la LEL PUE-6. Datos tomados a los 30 días de cultivo.

Tratamiento (mg L ⁻¹)	Longitud (mm)			Porcentajes			Supervivencia
	Embrión	Cotiledones	Raíz	Embriones con raíz ≥ 5 mm	Embriones con secundaria	Embriones con callo	
Testigo 0	14.7±1.9 a	5.3±0.8 a	7.6±0.8 a	32.2±12.1 a	32.9±3.6 a	32.3±13.2 a	70.1±6.6 a
0.001 AG₃	17.4±1.8 a	4.0±0.7 a	5.3±0.3 a	12.7±12.7 a	29.1±10.9 a	32.0±12.1 a	48.5±15.0 a
0.01 AG₃	15.8±2.8 a	2.7±0.2 a	5.0±2 a	6.6±6.6 a	51.6±13.7 a	13.3±7.7 a	32.9±12.1 a
0.1 AG₃	15.8±2.0 a	6.0±2.0 a	2.4±1.2 a	6.6±6.6 a	51.3±7.0 a	6.6±6.6 a	32.9±3.6 a
F-Valor	0.4	1.6	4.29	1.5	1.5	1.6	3.0
Pr>F	0.7856	0.2260	0.0310	0.2742	0.2549	0.2366	0.0747

Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Los datos expresados fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arccos X^{1/2}$. Las medias de los valores porcentuales pertenecen a las de sus valores transformados.

Estos resultados se pudieran atribuir al tiempo que estuvieron expuestos los embriones al regulador (30 días), pudiendo necesitar solo un pulso, o pudiera no ser la etapa adecuada de aplicación del regulador. Ya que como se ha mencionado el tipo de regulador y la etapa de aplicación están altamente relacionados con los resultados obtenidos en el desarrollo de los embriones somáticos. Respecto a esta atribución Hernández *et al.* (1999) demuestran la influencia del genotipo en la respuesta a las sustancias reguladoras del crecimiento, al probar el efecto de dos brasinoesteroides (1 mg L^{-1}) BB-16 y BB-6 sobre el crecimiento y apariencia de callo y plantas de papa (*Solanum tuberosum*, L.) aplicados a microesquejes, encontrando además una acción positiva del regulador sobre el crecimiento de las plantas. Núñez *et al.* (2004) encuentran también un efecto positivo de los BRs al aumentar la inducción de callos y brotes a partir de cotiledones de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cuando se añadieron dos tipos de BR BB-6 y MH-5 (0.001 y 0.01 mg L^{-1}) en combinación con 0.1 mg L^{-1} de 6-BA.

De igual manera Palhares *et al.* (2004) aplicaron un tipo de BR (MH5) en plantas de eucalipto (*E. grandis* Hill ex Maiden x *E. urophylla*) en concentraciones de 0.01 y 0.10 mg L^{-1} el cual ayudo a incrementar la elongación de las plantas así como el número de hojas, estando bajo un sistema de multiplicación en inmersión temporal. Pullman *et al.* (2003) aplicaron dosis de BR que fueron de 0.005 - $0.25 \text{ } \mu\text{M}$ en embriones cigóticos de *Pinus taeda* L. que promovieron la formación de tejido embriogénico. Al contrario de estos resultados Aydin *et al.* (2006) aplicaron tratamientos con BR (0.1 , 0.5 , $1.0 \text{ } \mu\text{M}$) a callo embriogénico para inducir la regeneración de embriones somáticos encontrando que el regulador no favoreció

la multiplicación de los embriones en comparación con el control sin el regulador, aun así la concentración 0.5 μM mostro mayor número de embriones en etapa cotiledonar, donde posterior a esto transfieren los embriones somáticos a un medio MS con GA₃ obteniendo una frecuencia de germinación de 30 %. Comparando estos resultados en linaloe se aplicó el regulador a los embriones somáticos estando ya en etapa cotiledonar obteniéndose un aumento en la elongación del embrión y en el sistema radicular.

En un experimento realizado por Canhoto *et al.* (1999) utilizando como explantes embriones somáticos de *Myrtus communis* L. en etapa cotiledonar, ampliaron el porcentaje de germinación cuando el medio de cultivo fue adicionado con 0.29, 0.58 y 1.44 mM de GA₃, además de indicar que cuando este regulador es combinado en 6-BA los embriones produjeron brotes adventicios. Aunque en linaloe el GA₃ no contribuyo a la formación del brote apical si aumento la elongación del embrión y el desarrollo de raíz. Dichos autores también mencionan que el desarrollo de los embriones se da mediante una forma asincrónica como ya se ha mencionado que sucede en linaloe y en la mayoría de los sistemas embriogénicos. Montero-Córtes *et al.* (2010) señalan de igual manera que en *Cocos nucifera* L. aumenta el porcentaje de embriones somáticos germinados de 13 % a 20 % a los 60 días, cuando se adiciona el medio de cultivo con 0.5 μM AG₃.

En *Swietenia macrophylla* se estudió el efecto de 6-BAP (0.2, 0.4 y 0.6 mg L⁻¹) y AG₃ (1.0 y 2.0 mg L⁻¹) en la germinación embriones somáticos en etapa cotiledonar obteniendo el mayor número de embriones somáticos con germinación total (brote y raíz) en el medio de cultivo sin reguladores, donde destacan que en los tratamientos donde se le agregó al medio de cultivo AG₃ los embriones somáticos solamente emitieron brotes (Collado *et al.*, 2005). Caso contrario ocurrió con linaloe donde los embriones solo emitieron raíz además que los resultados indican que a mayor concentración de AG₃ la supervivencia disminuye.

5.4 Aclimatación de plántulas provenientes de embriones somáticos de linaloe en invernadero

Durante los 30 días que las plántulas permanecieron en una caja de plástico transparente dentro del cuarto de incubación, se obtuvo el 83.3 % de supervivencia en ambos tratamientos, de éstas el 86.7 % tuvieron brotación nueva, obteniéndose el 56.7 % en el sustrato con tezontle, corteza de pino y peat moss (30:30:40, v/v/v) (sustrato 2) y 26.7 % en el sustrato con aserrín compostado y perlita (60:40, v/v) (sustrato 1) y con un incremento de altura significativamente mayor ($p \leq 0.0002$) para el sustrato 2.

En esta etapa, las plantas regeneradas por embriogénesis desarrollan hojas con tres folíolos y las plantas adultas que crecen en el campo, desarrollan hojas conformadas por 3 y hasta 7 folíolos (Rzedowski *et al.*, 2005). Una vez conseguida la adaptación, se observó la brotación de nuevas hojas compuestas por 5 folíolos y

esto ocurrió un mes después de haber sido trasplantadas al sustrato. El porcentaje de supervivencia después de cinco meses de establecer las plantas a condiciones de invernadero fue del 66.7 %. Del total de plantas vivas el 33.3 % registró la brotación de hojas compuestas por 5 folíolos y el 16.7 % presentó la formación de ramas nuevas (Figura 29).



Figura 29. Hojas de plantas de linaloe provenientes de embriones somáticos después de cinco meses en condiciones de invernadero.

Después de cuatro meses del trasplante de las plantas a suelo la brotación sufrió paro de crecimiento, empezando a perder su follaje a finales del mes de

septiembre (Cuadro 12). Este comportamiento se atribuyó al comportamiento natural de la especie ya que es una especie caducifolia.

De la muestra destructiva que se tomó al final de la evaluación, se encontró que el sustrato tuvo efectos significativos en el número de hojas y el área foliar y los valores fueron superiores en el sustrato 2. Respecto a la altura y diámetro del tallo, no se encontraron diferencias significativas, pero cabe mencionar que los valores más altos se encuentran en el mismo sustrato. Las plantas con mayor área foliar fueron también las que acumularon más materia seca (Cuadro 13).

En cuanto al desarrollo del sistema radical, después de cinco meses se observó que hubo más de una raíz primaria en la mayoría de las plantas. También se observaron algunas raíces que crecieron en espiral en donde principia la raíz, además del crecimiento de algunas raíces adventicias. Las plantas establecidas en el sustrato 2 desarrollaron mayor número de raíces con mayor longitud que las establecidas en el sustrato 1, a pesar de que los resultados estadísticos no muestren diferencia significativa (Cuadro 14 y Figura 30).

Cuadro 12. Efecto del tipo de sustrato en el incremento de altura en plantas provenientes de embriones somáticos de linaloe después de seis meses en aclimatación.

Sustrato	Incrementos de altura (cm)					
	1 Junio	2 Julio	3 Agosto	4 Septiembre	5 Octubre	6 Noviembre
Aserrín compostado + agrolita	0.3±0.1 b	0.2±0.1 a	0±0 b	0±0 a	0±0 b	0±0
Tezontle +corteza de pino + peat moss	1.4±0.3 a	0.3±0.1 a	0.4±0.1 a	0.1±0.1 a	0.3±0.1 a	0±0
F-valor	18.2	1.1	5.7	1.8	4.6	.
Pr>F	0.0002	0.312	0.0262	0.1974	0.0438	.

Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 13. Efecto de dos tipos de sustrato en el desarrollo de plantas de linaloe provenientes de embriones somáticos después de seis meses de aclimatación.

Sustrato	Altura inicial (cm)	Altura final (cm)	Diámetro (mm)	Número de hojas	Área foliar (cm ²)	Materia seca acumulada (g)		
						Raíz	Parte aérea	Total
Aserrín compostado + agrolita	3.1±0.4 a	4.2±0.8 a	0.4±0.03 a	1.6±0.7 b	7.4±3.5 b	0.09±0.04 a	0.07±0.03 a	0.17±0.07 a
Tezontle + corteza de pino + peat moss	2.9±0.4 a	5.6±1.1 a	0.5±0.06 a	6.8±1.9 a	55.0±18.1 a	0.15±0.04 a	0.26±0.07 a	0.41±0.1 a
F-valor	0.05	1.3	0.5	6.1	6.7	0.8	4.7	2.8
Pr>F	0.8244	0.2818	0.4882	0.0325	0.0273	0.3907	0.0554	0.1228

Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 14. Efecto del tipo de sustrato en el desarrollo de la raíz en plantas provenientes de embriones somáticos de linaloe a los seis meses fuera de la condición *in vitro*.

Sustrato	Número de raíces			Longitud de raíz (cm)		Peso (g)
	Primarias	Secundarias	Terciarias	Primarias	Secundarias	
Aserrín compostado + agrolita	1.8±0.3 a	3.8±0.5 a	9.2±2.0 a	6.2±1.6 a	3.0±0.6 a	0.5±0.2 a
Tezontle + corteza de pino + peat moss	2.8±0.8 a	5.7±2.3 a	19.0±7.8 a	8.5±0.9 a	4.4±0.8 a	0.7±0.2 a
F-valor	1.4	0.5	1.2	1.6	1.8	0.6
Pr>F	0.2666	0.4938	0.3172	0.2408	0.2138	0.4478

Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).



a)



b)

Figura 30. Sistema radical de las plantas de linaloe provenientes de embriones somáticos después de 5 meses en invernadero. a) Plantas establecidas en la mezcla de tezontle, corteza de pino y peat moss (30:30:40, v/v/v) y b) plantas establecidas en el sustrato de aserrín compostado y agrolita (60:40, v/v).



Figura 31. Planta proveniente de semilla de un año de edad.

Se puede considerar que las plantas regeneradas a partir de embriones somáticos de linaloe fueron capaces de adaptarse a las condiciones de invernadero y crecer normalmente. Estas plantas somáticas se compararon morfológicamente con una planta proveniente de semilla (Figura 31) y no se distinguen diferencias en su estructura y crecimiento.

Debido a que las plántulas que han crecido *in vitro* han sido expuestas continuamente a un microambiente único que ha sido seleccionado para proporcionar un mínimo de estrés y las condiciones óptimas para su desarrollo, éstas se convierten de cierta manera en individuos heterótrofos (Pospíšilová *et al.*, 1999; Hazarika, 2006). Después de la transferencia *ex vitro*, estas plántulas fácilmente podrían verse afectadas por cambios bruscos en las condiciones ambientales y por lo tanto necesitan de un periodo de aclimatación (Kumar y Rao,

2012). Vega y Prehn (2005) recomiendan que se deben realizar investigaciones adicionales para la aclimatación de plantas obtenidas por micropropagación *in vitro*.

Para incrementar la supervivencia de las plántulas en la fase de aclimatación, el ambiente (luz, humedad relativa, temperatura, etc.) debe ser manipulado de forma tal, que al comienzo de la aclimatación se deben simular las condiciones en las que se cultivaron las plantas *in vitro* (Rodríguez *et al.*, 2000).

Santana *et al.* (1996) indicaron que en la aclimatación de plantas provenientes de embriones somáticos de café (*Coffea arabica* L.) fue indispensable una cubierta o cámara húmeda en el invernadero, la cual ayudo a su buen desarrollo ya que a los seis meses se observó que tanto la altura como la emisión de las hojas en las plantas, alcanzaron valores promedios de 28.28 cm y 10.83 pares de hojas respectivamente. En plantas de cocotero (*Cocos nucifera*) provenientes de embriones somáticos también se utilizó una cubierta durante 60 días en el invernadero, en este caso fueron cubiertas con una bolsa transparente de polietileno además de utilizar un nebulizador, con lo que se logró un 90 % de supervivencia después de un año en invernadero de un lote de 30 plantas (Azpeitia *et al.*, 2003). En otro caso en plántulas provenientes de semillas germinadas *in vitro* y estructuras somáticas parecidas a los protocormos de orquídea (*Laelia eyermaniana* Rchb. f.) que fueron trasplantadas a un sustrato de fibra de palma sayote, para su aclimatación colocadas en charolas con domo transparente que se fue retirando paulatinamente se obtuvo 46.9 % de supervivencia (Nava *et al.*, 2011). En linaloe el utilizar durante los primeros 30 días

de aclimatación la caja de plástico con cubierta y la permanencia de las plantas dentro del cuarto de incubación con la misma temperatura e intensidad de luz, ayudo a disminuir el estrés causado al ser retiradas de la condición *in vitro* mejorando dicho proceso.

Lee *et al.* (2010) lograron un 95 % de supervivencia en la aclimatación de plántulas provenientes de embriones somáticos de *Laelia anceps* ssp. *Dawsonii* que fueron transferidas en un sustrato compuesto por una mezcla de peat moss y piedra volcánica 1:1 (v/v) determinando el final del periodo con la aparición de una nueva hoja a los 30 días. Cabe mencionar que en linaloe también se desarrollaron nuevas hojas en el mismo periodo sin embargo se consideró evaluar la supervivencia por un periodo más prolongado.

En plántulas regeneradas de embriones somáticos de *Sorbus pohuashanensi* el porcentaje de supervivencia fue evaluado a los dos meses obteniendo un 74 %, donde se utilizó una cubierta de plástico que se fue levantando gradualmente hasta el día 30 del trasplante (Yang *et al.*, 2012). Por otra parte, Robichaud *et al.* (2004) indican que en embriones somáticos de castaño (*Castanea dentata*) obtuvieron un 8.78 % de germinación del cual seis plántulas sobrevivieron el trasplante a tierra y siguieron su crecimiento en invernadero. En otros casos (no en embriogénesis somática) se ha utilizado humus de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) como componente del sustrato en la aclimatación en invernadero de plantas micropropagadas de caña de azúcar (*Saccharum spp.*), favoreciendo la longitud de raíz y número final de plantas (Díaz *et al.*, 2004).

En la aclimatación de plantas *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) procedentes de la fase de enraizamiento se utilizaron sustratos basados en formulaciones de compost y casting solos o combinados con 15% de zeolita, que incrementaron la calidad fisiológica de las plantas *in vitro* para ser plantadas en el campo (Jiménez *et al.*, 2001). Martínez-Ruiz *et al.* (2005) alcanzaron una supervivencia de 85 y 75 % a los dos meses de la aclimatación de plántulas de 3 a 4 cm de altura obtenidas mediante micropropagación de dos especies de eucalipto (*Eucalyptus urophylla* y *Eucalyptus grandis*) en un sustrato con suelo arcillo arenoso y 10 % de agrolita, alcanzando una altura de 20 a 30 cm. Mientras que en este estudio de linaloe de 2.7 ± 0.2 cm de altura alcanzaron 26.1 cm en la mezcla tezontle, corteza de pino y peat moss (30:30:40, v/v/v) y 17 cm en la mezcla de aserrín compostado y agrolita (60:40, v/v) a los 12 meses.

Lavanya *et al.* (2008) mencionan que la supervivencia *ex vitro* de las plantas cultivadas *in vitro* dependerá de su capacidad de soportar la pérdida de agua y llevar a cabo la fotosíntesis, que se verá reforzada en la aclimatación progresiva. La luz es uno de los factores que se deben manejar con cuidado en los primeros momentos de permanencia de las plántulas en las condiciones *ex vitro* ya que no deben ser sometidas a altas intensidades de iluminación (Rodríguez *et al.*, 2000). Por dicho motivo cuando se realizó el trasplante de las plantas de linaloe a sustrato se mantuvieron las mismas condiciones de luz y temperatura por 30 días antes de pasarlas al invernadero.

Barry-Etienne *et al.* (2002) indican que las raíces de plántulas de embriones somáticos de café (*Coffea arabica* L.), cuando se encuentran en condiciones *in*

vitro son gruesas, carentes de pelos radicales y no tan ramificadas, pero después del trasplante a sustrato, las plántulas desarrollan un sistema radicular similar a las de plántulas germinadas en condiciones *ex vitro*. Este mismo patrón de desarrollo radical se presenta en linaloe observado mediante una evaluación visual al comparar una plántula somática con una proveniente de semilla no encontrándose diferencias entre ellas.

Hazarika (2006) indican que se han observado cambios en la anatomía de las hojas durante la aclimatación; los fenotipos de las hojas nuevas formadas *ex vitro* varían con la especie, los entornos de trasplante y la edad del trasplante. La mayoría de las especies de *Bursera* tienen hojas con pares de folíolos ovalados y el margen suele ser entero o aserrado y las de linaloe están conformadas por 3 o hasta 7 folíolos (Andrés-Hernández *et al.*, 2012; Rzedowski *et al.*, 2005). Sin embargo, las plantas cultivadas *in vitro* desarrollaron solo hojas de tres folíolos pero al llevarlas a invernadero su adaptación permitió la brotación de hojas nuevas compuestas por 5 folíolos a un mes y después de cinco meses se observó el crecimiento de hojas compuestas por 7 folíolos. Al respecto Barry-Etienne *et al.* (2002) mencionan que el crecimiento de plántulas se limita por el volumen del recipiente de cultivo bajo condiciones *in vitro*.

5.4.1 Comportamiento e identificación de estomas

Los estomas son aperturas especializadas de la epidermis foliar que participan en el intercambio gaseoso entre la atmósfera y los espacios aéreos internos, su principal función es permitir la entrada de la cantidad suficiente de

CO₂ para optimizar la fotosíntesis y preservar la mayor cantidad posible de agua (Willmer y Fricker, 1996). En plantas cultivadas *in vitro* el funcionamiento de los estomas se ve afectado debido al exceso de humedad en el que se encuentran provocando una excesiva pérdida de agua cuando salen de esta condición (Hazarika, 2006). Sallanon *et al.*, (1993) observó que los estomas de hojas desarrolladas *in vitro* están completamente desarrollados y poseen una ultraestructura adecuada para su funcionamiento, explicando que la falta de funcionalidad de éstos se atribuía a las condiciones hídricas de desarrollo y de adaptación. En plántulas somáticas de café (*Coffea arabica* L.) los estomas en las hojas de plántulas regeneradas en sustrato tenían la misma forma elíptica y el mismo tamaño que los de hojas de la plántulas de semilla sin embargo, los estomas de hojas de plántulas que aún se encuentran *in vitro* eran más grandes, redondos y elevados (Barry-Etienne *et al.*, 2002).

Se ha observado que un pretratamiento de endurecimiento gradual de las plántulas con reducción de la humedad y el incremento en la irradiancia *in vitro* son necesarios para su supervivencia en la transición del cultivo *in vitro* al invernadero (Capellades *et al.*, 1990). En plantas de tomate (*Physalis ixocarpa* Brot.) propagadas *in vitro* la apertura gradual de la cubierta plástica del sistema de aclimatación permitió la disminución paulatina del potencial hídrico, lo cual influyó en el incremento de la densidad estomática (Bazaldúa-Muñoz *et al.*, 2008). En el caso de plántulas de linaloe en los estomas se observó una diferencia en cuanto a la densidad estomática al comparar tres tipos de hojas 1 (hojas de tres folíolos de plántulas *in vitro* provenientes de embriones somáticos, 2 (hojas de tres folíolos de

plántulas provenientes de embriones somáticos adaptadas seis meses en invernadero y 3 (hojas de tres folíolos de planta proveniente de estaca mantenida en invernadero utilizada como planta modelo. Donde la diferencia se encuentra en las hojas de plantas somáticas con menor densidad en comparación con la hoja de la planta modelo (Figura 32). No encontrándose diferencia entre las hojas de la planta que aún se encuentra *in vitro* y las hojas de la planta con seis meses en invernadero. Sin embargo cabe mencionar que a pesar de no encontrarse diferencia en estos dos tipos de hojas, las plantas somáticas en invernadero comenzaron a desarrollar hojas compuestas por 5 y 7 folíolos, cosa que no sucede cuando la planta permanece en la condición *in vitro*. Y que a más de un año de seguir en invernadero las plantas siguen en crecimiento y muestran un aspecto vigoroso y saludable (Figura 34).

Con relación al tipo de estomas presentes en *Bursera linanoe* no existen reportes, sin embargo Castro y Torrecilla (2013) describieron la micromorfología de la epidermis de seis especies de *Bursera*, encontrando que las hojas son hipostomáticas las células de la epidermis tienen paredes anticlinales rectas y estomas anomocíticos, es decir sin células anexas, en la Figura 32, se puede observar que linaloe también presenta este tipo de estomas con tricomas tectores y glandulares (Figura 33). Los pelos tectores son unicelulares y los tricomas glandulares presentan un pie corto y una cabeza globosa multicelular.

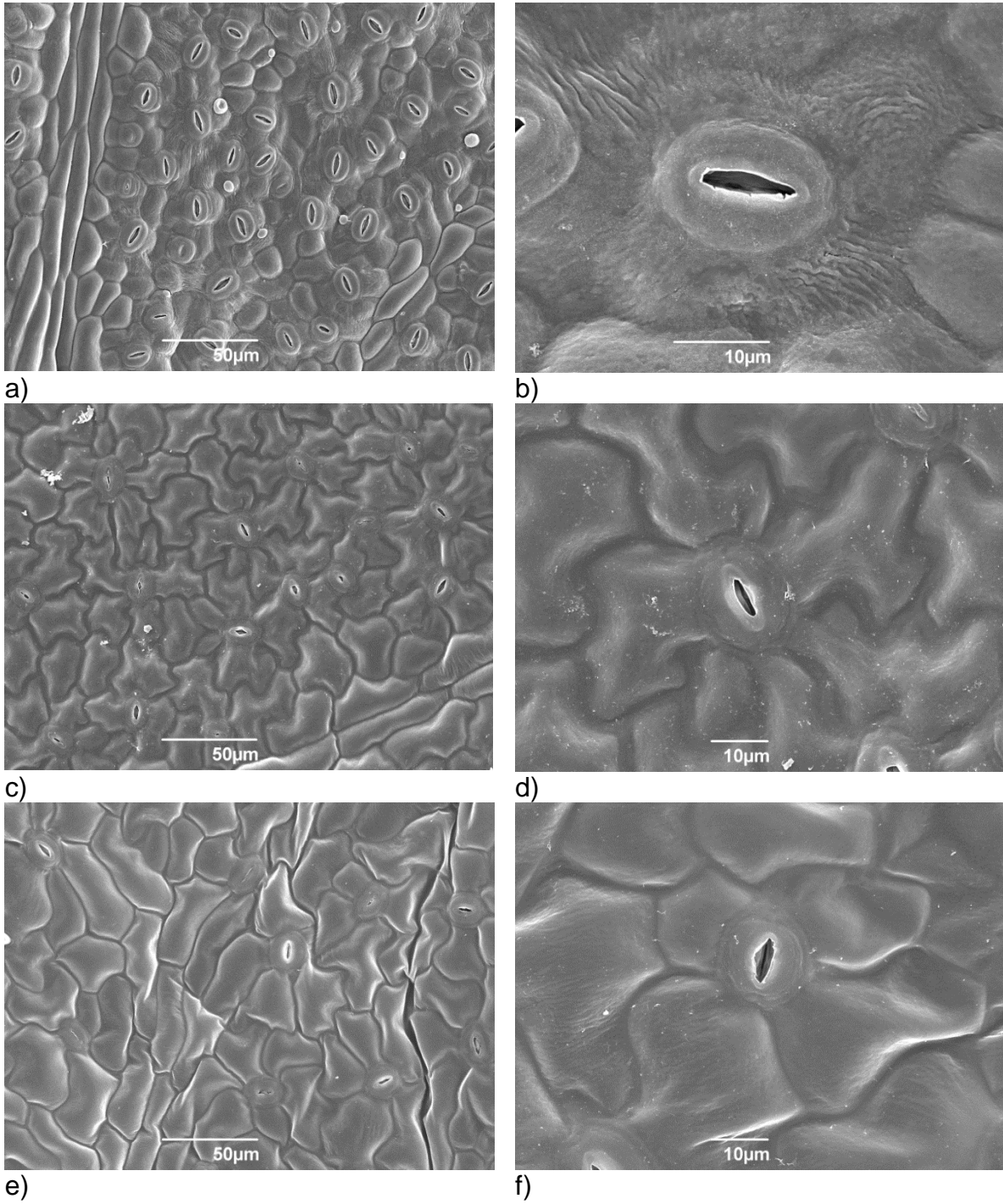
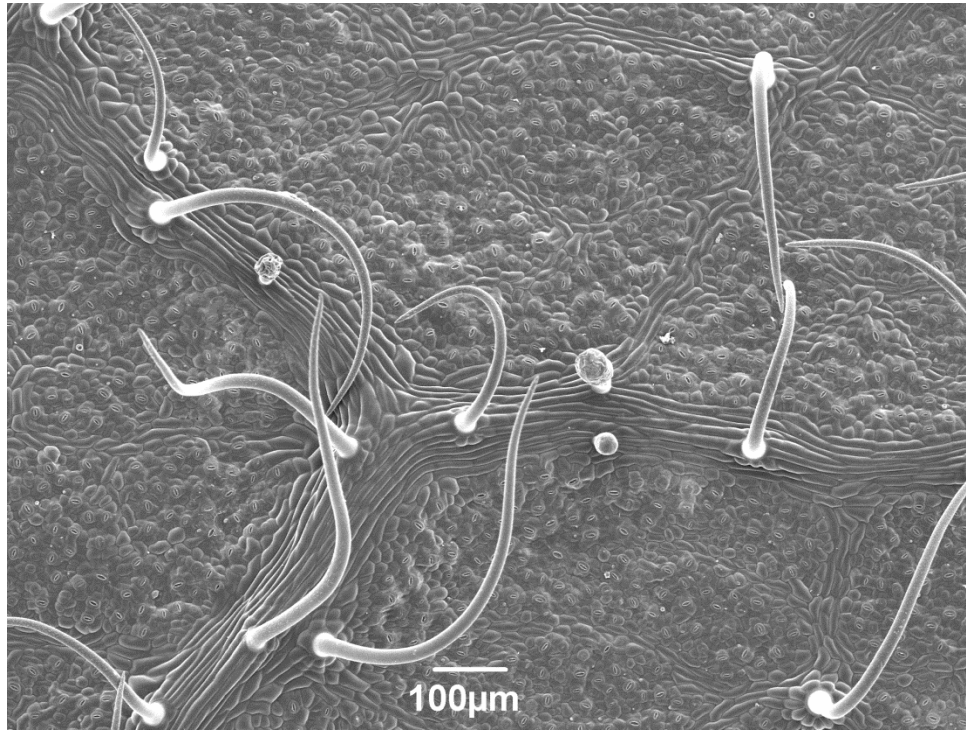
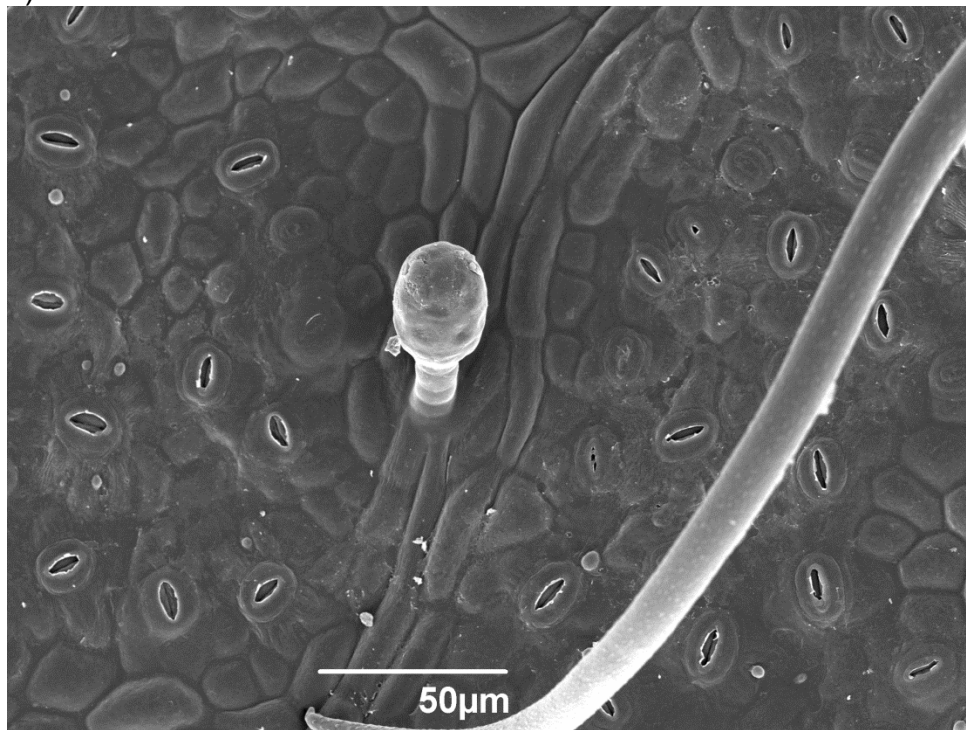


Figura 32. Estomas de *Bursera linanoe*. a) y b) Estomas en hoja de tres folíolos de planta proveniente de estaca mantenida en invernadero utilizada como planta modelo. c) y d) Estomas en hoja de tres folíolos de plántula provenientes de embriones somáticos adaptada durante seis meses en invernadero. e) y f) Estomas en hoja de tres folíolos de plántula *in vitro* provenientes de embriones somáticos.



a)



b)

Figura 33. Tipo de tricomas de *Bursera linanoe*. a) pelos tectores unicelulares. b) Tricoma glandular multicelular.



Figura 34. Planta de linaloe proveniente de embrión somático después de 18 meses en invernadero.

6. CONCLUSIONES

- Se encontró que existe una influencia positiva del carbón activo en la apariencia, calidad del material vegetal y mayor tasa de multiplicación en los medios adicionados con este compuesto.
- Se encontró que existe una diferencia entre genotipos en el crecimiento y desarrollo de los embriones somáticos, encontrándose que las líneas embriogénicas LEL 61-4 y LEL PUE-6 tienen una mayor tasa de multiplicación, así como mejor apariencia a diferencia de la LEL B-3 que además presenta frecuentemente necrosis.
- La línea embriogénica LEL B-3 mantuvo niveles altos de etileno durante mayor tiempo y presentó mayor sensibilidad al gas, alcanzando con mayor rapidez la senescencia del material vegetal.
- La maltosa al 4 % fue el mejor tratamiento para la maduración de los embriones, además que presentó menor porcentaje de embriogénesis secundaria en comparación con sacarosa. Lo que indica que la maltosa ejerce mayor potencial osmótico en el medio que hace que disminuya considerablemente el problema de embriogénesis secundaria.
- Los niveles evaluados de ABA y PEG no favorecieron la maduración del embrión somático en la línea LEL 61-4. Pero los porcentajes de embriogénesis secundaria que presentó el ABA, revelaron que puede ser un regulador a probar en la multiplicación y mantenimiento de los embriones somáticos.

- La menor concentración de BR favoreció al desarrollo de raíz en los embriones, pero no contribuyó a la formación del brote apical. Este regulador produjo una disminución de los porcentajes de embriogénesis secundaria y formación de callo.
- El aumento en las fuentes de carbono en combinación con BR, no contribuyeron al desarrollo de los embriones somáticos ya que los porcentajes de supervivencia fueron bajos.
- En AG₃, no favoreció al desarrollo de los embriones somáticos, ya que la mayoría de estos se necrosaron y tendieron a curvarse, presentando un porcentaje de supervivencia bajos.
- Se observó una menor densidad estomática en hojas de plantas provenientes de cultivo *in vitro* en comparación con las de la planta adulta proveniente de estaca.
- Se encontró que linaloe presenta estomas anomocíticos y tricomas tectores y glandulares. Los pelos tectores son unicelulares y los tricomas glandulares presentan un pie corto y una cabeza globosa multicelular.
- El mejor sustrato para la aclimatación de plantas de linaloe de *in vitro* a *ex vitro* fue el tezontle + corteza de pino + peat moss 30-30-40 (v/v/v).
- Las plantas regeneradas a partir de embriones somáticos de linaloe se adaptaron a las condiciones de invernadero y crecieron de forma normal igual que las plantas provenientes de semilla, sin distinción en estructura y crecimiento. A más de un año de permanecer en invernadero las plantas siguen en crecimiento y muestran un aspecto vigoroso y saludable.

7. LITERATURA CITADA

- Abeles, F. B., P. W. Morgan., and M. E. Salveit. 1992. Ethylene in Plant Biology. Second Edition. Academic Press. San Diego, USA. 226 p.
- Aguilar V., M. E., J. L. Ortiz V., y J. A. Sandoval F. 2008. Embriogénesis somática en plátanos y bananos: perspectivas y limitaciones. Serie técnica. Boletín técnico/CATIE; No 27.
- Ammirato, P. V. 1977. Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway interactions of abscisic acid, zeatin, and gibberellic acid. *Plant Physiology* 59: 579-586.
- Ammirato, P.V. 1983. The regulation of somatic embryo development in plant cell culture: Suspension culture techniques and hormones requirement. *Biotechnology* 1: 68-74.
- Ammirato, P.V. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. *In*: CE Green, DA Somers, WP Hackertt, DD Biesboer (eds.). *Plant Tissue and Cell Culture*. 57-82.
- Andrés-Hernández, A. R., y D. Espinosa-Organista. 2002. Morfología de plántulas de *Bursera* Jacq. Ex L. (Burseraceae) y sus implicaciones filogenéticas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 70: 5-12.
- Andrés-Hernández, R., D. Espinosa., M. E. Fraile-Ortega. and T. Terrazas. 2012. Venation patterns of *Bursera* species Jacq. ex L. (Burseraceae) and systematic significance. *Plant Systematics and Evolution*. 298:1723–1731.

- Arellano-Ostoa G, S González-Bernal y E Sánchez-Arreola. 2009. Embriogénesis somática de linaloe (*Bursera linanoe*, La Llave) utilizando cotiledones y hojas jóvenes en expansión como explantes. LV Anual Meeting Of (A.S.H.S.) International Society Tropical Horticulture. Lara, Venezuela.
- Arellano-Ostoa G, S. González-Bernal y E. García-Villanueva. 2011. Propagación *in vitro* y por estacas de linaloe (*Bursera aloexylon* L.) procedente de los estados de Guerrero, Puebla y Morelos, México *In: Linaloe cultivo y aprovechamiento*. Ayala S., J. C. y S. I. Ayala F. (eds). Fundación Produce Puebla, A. C. Puebla, México. pp: 261-288.
- Arellano-Ostoa, G., S. González-Bernal. y G. Arellano-Hernández. 2012. Enraizamiento de estacas con características juveniles y adultas de árboles nativos de linaloe (*Bursera linanoe* (La Llave & Rzedowsky, Calderón y Medina). XXIV Congreso Nacional y IV Internacional de Fitogenética.
- Attree, S.M., Budimir S. and Fowke L.C. 1990. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured shoots and cotyledons of seedlings from stored seeds of black and white spruce *Picea mariana* and *Picea glauca*. Canadian Journal of Botany 68: 30-34.
- Ayala S. J. C. 2009. Existencias reales, distribución y condiciones generales de crecimiento del linaloe (*Bursera aloexylon*) en Guerrero, Puebla y Morelos, México. *In: Linaloe cultivo y aprovechamiento*. Ayala S., J. C. y S. I. Ayala F. (eds). Fundación Produce Puebla, A. C. Puebla, México. pp: 1-19.

- Aydin, Y., T. Talas-Ogras., Z. Ipekci-Altas. and N. Gozukirmizi. 2006. Effects of brassinosteroid on cotton regeneration via somatic embryogenesis. *Biología*, Bratislava 61(3): 289-293.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20: 153-175.
- Azpeitia, M., A., L. Sáenz C., J. L. Chan. y C. Oropeza S. 2003. Inducción de embriones somáticos en explantes de plúmula de cocotero por ácido abscísico y polietilenglicol. *Revista Fitotecnia Mexicana* 26 (4):309-318.
- Barry-Etienne, D., B. Bertrand., N. Vasquez. and H. Etienne. 2002. Comparison of Somatic Embryogenesis-derived Coffee (*Coffea arabica* L.). Plantlets Regenerated *in vitro* or *ex vitro*: Morphological, Mineral and Water Characteristics. *Annals of Botany* 90: 77-85.
- Bazaldúa-Muñoz, C., E. Ventura-Zapata., G. Salcedo-Morales., U. Maldonado A. y A. López G. 2008. Densidad estomatal y potencial hídrico en plantas de tomate (*Physalis ixocarpa* Brot.), Propagadas por cultivo de meristemas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(2): 147-150.
- Bonfil, S, C., P. Mendoza E. y J. A. Ulloa N. 2007. Enraizamiento y formación de callos en estacas de siete especies del género *Bursera*. *Agrociencia* 41: 103-109.

- Bonfil-Sanders, C., I. Cajero-Lázaro, R. e Y. Evans. 2008. Germinación de semillas de seis especies de *Bursera* del centro de México. *Agrociencia* 42 (7): 827-834.
- Borja de la Rosa, A., M. Fuentes-López., E. Cruz-Cruz., V. Mariles-Flores., D. Vargas-Álvarez., D. Ayerde-Lozada., F. Solares-Arena., M. González-Cárdenas., S. Orozco-Cirilo., J. F. Castellanos-Bolaños. y V. Serrano-Altamirano. 2009. Características tecnológicas de la madera de linaloe (*Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón & Medina). *In*: Cruz-Cruz, E.; V. Mariles-Flores; M. González-Cárdenas; D. Varga-Álvarez. Fundamentos Técnicos para el Manejo de Poblaciones Naturales de Linaloe en México. INIFAP, México. . Libro técnico No. 14. INIFAP. Valles Centrales Oaxaca 222-244.
- Bozzolla, J. J. and D. L. Russell. 1985. Electron microscopy; Principles and Techniques for Biologists. Center for electron microscopy Southern Illinois. University Carbondale, Illinois. 542 p
- NAGMANI, R., BONGA, J.M. Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. *Canadian Journal of Forest Research* 15:1088-1091.
- Canhoto, J. M., M. L. Lopes. and G. S. Cruz. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (Myrtaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57: 13-21.

- Capellades, M., Fontarnau, R., Carulla, C. and P. Debergh. 1990. Environment influences anatomy and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. Journal of the American Society for Horticultural Science. 115 (1):141-145.
- Carrier, D. J., J. E. Cunningham., D. C. Taylor. and D. I. Dunstan. 1997. Sucrose requirements and lipid utilization during germination of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) somatic embryos. Plant Cell Reports 16: 550-554.
- Carron, M. P., H. Etienne., L. Lardet., S. Campagna., Y. Perrin., A. Leconte. and C. Chaine. 1995. Somatic embryogenesis in rubber (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). *In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants Forestry Sciences* , S. Mohan Jain, Pramod K. Gupta, Ronald J. Newton Vol.44-46: 117-136.
- Castellanos-Castro, C. y C. Bonfil S. 2010. Establecimiento y crecimiento inicial de estacas de tres especies de *Bursera Jacq.* ex L. Revista Mexicana de Ciencias Forestales 1: 93-108.
- Castro, M.E. y Torrecilla, P. 2013. Estudio de la epidermis foliar en algunas especies de *Bursera Jacq.* Ex L. (Burseraceae) y sus implicaciones taxonómicas. Acta Botánica Mexicana 105:11-29.
- Celestino, C., I. Hernández., E. Carneros., D. López V. y M. Toribio. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales 14: 345-357.

- Chalupa, V. 1985. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. Comm. Inst. For. 14: 57-63.
- Collado, R., R. Barbón., D. Agramonte., F. Jiménez., M. Pérez. y O. Gutiérrez. 2005. Germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* en medios de cultivo semisólidos. Biotecnología Vegetal 5 (1): 17 -21.
- Collado, R., R. Barbón., D. Agramonte., F. Jiménez-Terry., M. Pérez., O. Gutiérrez. y M de la O. 2007. Efecto de la deshidratación y la sacarosa en la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King. Biotecnología Vegetal 7 (1): 35-39.
- CONANP y SEMARNAT. 2005. Programa de conservación y manejo reserva de la biosfera de la Sierra de Huautla. Comisión Nacional de Áreas Protegidas, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México. D.F. 195 p.
- Corredoira, E., A. Ballester., F. J. Vieitez. and A. M. Vieitez. 2005. Somatic Embryogenesis in Chestnut. Plant Cell Monograph 2:177-199.
- Corredoira, E., Ballester A. and Vieitez A. M. 2003. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill., somatic embryos originated from leaf explants. Annals of Botany 92: 129-136.
- Corredoira, E., S. Valladares. and A. M. Vieitez. 2006. Morphohistological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*. In Vitro Cell Developmental Biology Plant 42:525-533.

Clouse, S. D. y J. M. Sasse. 1998. Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:427-451.

Cruz-Cruz, E., V. Mariles-Flores., Solares-Arenas F., M. Gómez-Cárdenas., V. Serrano-Altamirano., D. Ayerde-Lozada., M. E. Fuentes-López., J. F. Castellanos-Bolaños., S. Orozco-Cirilo., D. Vargas-Álvarez., y A. Borja de la Rosa. 2009a. Adaptación ecológica y climática de linaloe (*Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón y Medina). *In*: E. Cruz-Cruz., V. Mariles-Flores., M. Gómez-Cárdenas. y D. Vargas-Álvarez (eds.). Fundamentos técnicos para el manejo de poblaciones naturales de linaloe (*Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón y Medina) en México. Libro técnico No. 14. INIFAP. Valles Centrales Oaxaca 1-31 p.

Cruz-Cruz, E., M. Gómez-Cárdenas., D. Vargas-Álvarez., Solares-Arenas F., V. Mariles-Flores., D. Ayerde-Lozada., S. Orozco-Cirilo., M. E. Fuentes-López., A. Borja de la Rosa., J. F. Castellanos-Bolaños., y V. Serrano-Altamirano. 2009b. Colecta de fruto, selección y germinación de semilla de *Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón y Medina). *In*: E. Cruz-Cruz., V. Mariles-Flores., M. Gómez-Cárdenas. y D. Vargas-Álvarez (eds.). Fundamentos técnicos para el manejo de poblaciones naturales de linaloe (*Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón y Medina) en México. Libro técnico No. 14. INIFAP. Valles Centrales Oaxaca 140-164.

- Deng, M. and D. Cornu. 1992. Maturation and germination of walnut somatic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 28:195-202.
- Díaz L., P., L. F Medina., J. Latife., P. A. Digonzelli. y S. B. Sosa. 2004. Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 33 (2): 115-128.
- Dodeman, V. L., G. Ducreux. and M. Kreis. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48 (313):1493-1509.
- Dudits, D., J. Györgyey., L. Bögre. and L. Bakó. 1995. Molecular biology of somatic embryogenesis. *In Vitro Embryogenesis in Plants Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture* 20: 267-308.
- Dudits, D., L. Bogre and J. Gyorgyey. 1991. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *Journal of Cell Science* 99: 475-484.
- Espinosa, D. 2007. Catálogo de autoridades taxonómicas de las burseráceas (Burseraceae: Magnoliopsida) de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Base de datos SNIB-CONABIO, proyecto BS001. México.
- Ettienne, H., P. Montoro., N. Michaux-Ferriere. and M. P. Carron. 1993. Effects of desiccation, medium osmolarity and abscisic acid on the maturation of

Hevea brasiliensis somatic embryos. Journal of Experimental Botany 44:1613-1619.

Fernando, S. C. and C.K.A. Gamage. 2000. Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). Plant Science. 151:193-198.

Fila, G., J. Ghashghaie., J. Hoarau. and G. Cornic. 1998. Photosynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatisation. Physiologia Plantarum 102 (3): 411-418.

García, D. 2000. Acción del análogo de brasinoesteroides mh5 y la kinetina en la formación de biomasa en callos de *coffea canephora* var. robusta. Cultivos Tropicales 21(3):39-45.

Gaspar, T.A., C. Kevers, C. Panel, H. Greppin, D.M. Reid and T.A. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In vitro Cell Developmental Biology Plant 32: 272-289.

Gomez-Cardenas, M. 2009. Recomendaciones y fundamentos técnicos a considerar para el manejo sustentable de plantaciones naturales de linaloe (*Bursera linanoe* (La Llave) Rezedowski, Calderón y Medina). INIFAP. CIRPAS. Campo experimental Valles centrales de Oaxaca. Publicación especial No. 5. 61 p.

Gupta, P., K., S.V. Kendurkar., V. M. Kulkarni., M.V. Shirgurkar. and A. F. Mascarenhas. 1984. Somatic embryogenesis and plants from zygotic

- embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) in vitro. *Plant Cell Reports* 3: 222-225.
- Haberlandt, G. 1902. Culture experiments with isolated plant cells. *Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitz-Ber. Mat.-Nat. Kl. Kais. Akademie der Wissenschaften in Wien, Sitzungsberichte, Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse, Abteilung 111 (1):69-92.*
- Hakman, I., L.C. Fowke., S. von Arnold. and Eriksson T. 1985. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Science* 38: 53-59.
- Halperin, W. 1966. Alternative Morphogenetic Events in Cell Suspensions. *American Journal of Botany* 53 (5): 443-453.
- Hazarika, B. N. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science* 85 (12): 1704-1712.
- Hazarika, B. N. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae* 108: 105-120.
- Hernández M., M., O. Moré. y M. Nuñez. 1999. Empleo de análogos de brasinoesteroides en el cultivo *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum*, L.). *Cultivos Tropicales* 20 (4):41-44.
- Hernández-Pérez, E., M. González-Espinosa., I. Trejo. y C. Bonfil. 2011. Distribución del género *Bursera* en el estado de Morelos, México y su relación con el clima. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 964-976.

- Hersch M., P., R. Glass. y A. Fierro A. 2004. El [Linaloe *Bursera aloexylon* (Schiede ex Schltdl) Engl.]. Una madera aromática entre la tradición y la presión. En: Productos Forestales, Medios de Subsistencia y Conservación: Estudios de Caso Sobre Diversos Sistemas de Manejo de Productos Forestales No Maderables. Volumen I – Latino America (pp. 433–462). Bogor, Indonesia: Center for International Forestry Research (CIFOR).
- Iwasaki, T. and H. Shibaoka. 1991. Brassinosteroids Act as Regulators of Tracheary-Element Differentiation in Isolated Zinnia Mesophyll Cells. *Plant Cell Physiology* 32(7): 1007-14.
- JayaSree, T., U. Pavan., M. Ramesh., A.V. Rao., K. J. Mohan R. and A. Sadanandam. 2001. Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 13–17.
- Jiménez T., F. A., D. Agramonte P., J.N. Pérez P., D. Ramírez A., O. Gutiérrez M. and M. Pérez P. 2001. Aclimatización de plantas *in vitro* de *Solanum tuberosum* (L.) variedad Desiree. *Biotecnología vegetal* 1 (2): 103-108.
- Jiménez, V. M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* 47:91-110.
- Johnson, T. S., S. B. Narayan. and D. B. A. Narayana. 1997. Rapid *in vitro* propagation of *Saussurea lappa*, an endangered medicinal plant, through multiple shoot cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 33(2): 128-130.

- Kiyosue, T., K. Yamaguchi-Shinozaki., K. Shinozaki., H. Kamada. and H. Harada. 1993. cDNA cloning of ECP40, an embryogenic-cell protein in carrot, and its expression during somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Molecular Biology* 21:1053-1068.
- Klimaszewska, K., J. F. Trontin., M. R. Becwar., C. W. Devillard., Y. S. Park. and M. A. Lelu. 2007. recent progress in somatic embryogenesis of four *Pinus spp.* *Tree and Forestry Science and Biotechnology* (1): 11-25.
- Klimaszewska, K., M. Bernier-Cardou., D. R. CYR. and B. C. S. Sutton. 2000. Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. *In Vitro Cell and Developmental Biology Plant* 36: 279-286.
- Kong, L., and P. von Aderkas. 2007. Genotype effects on ABA consumption and somatic embryo maturation in interior spruce (*Picea glauca* 3 *engelmanni*). *Journal of Experimental Botany* 58 (6): 1525-1531.
- Kong, L., S.M. Attree., D.E. Evans., P. Binarova., E.C. Yeung. and L.C. Fowke. 1999. Somatic embryogenesis in white spruce: studies of embryo development and cell biology. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ, editors. *Somatic embryogenesis in woody plants. Vol. IV.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers: 1-28.
- Krajňáková, J., D. Gomory. and H. Haggman. 2008. Somatic embryogenesis in Greek fir. *Canadian Journal of Research* 38:760-769.

- Krikorian, A. D. and D. L. Berquam. 1966. Plant cell and tissue cultures: the role of haberlandt. *The Botanical Review* 59-68.
- Kumar, K. and I. U. Rao. 2012. Morphophysiologicals Problems in Acclimatization of Micropropagated Plants in - *Ex Vitro* Conditions- A Reviews. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants* 2 (4): 271-283.
- Kumar, S., K. C. Sonie. and K. G. Ramawat. 2004. Development of resin canals during somatic embryogenesis in callus cultures of *Commiphora wightii*. *Indian Journal of Biotechnology* 3: 267-270.
- Kumar, S., M. Mathur., A. K. Jain. and K. G. Ramawat. 2006. Somatic embryo proliferation in *Commiphora wightii* and evidence for guggulsterone production in culture. *Indian Journal of Biotechnology* 5: 217-222.
- Lavanya, M., B. Venkateshwarlu. and B. Poornasri D. 2008. Acclimatization of neem microshoots adaptable to semi-sterile conditions. *Indian Journal of Biotechnology* 8: 218-222.
- Lee E., H. E., A. Laguna C., J. Murguía G., L. Iglesias A., B. García R., D. Escobedo L., Y. M. Martínez O., F. A. Barredo P. y N. Santana B. 2010. Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *Dawsonii*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33: 323-332.
- Lelu, M. A., C. Bastiena., A. Drugeaulta., M. L. Goueza. and K. Klimaszewska. 1999. Somatic embryogenesis and plantlet development in

Pinus sylvestris and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiologia Plantarum* 105: 719-728.

Li X. Y., F. H. Huang and E. E. Gbur, JR. 1997. Polyethylene glycol-promoted development of somatic embryos in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant* 33:184-189.

Lipavská, H., H. Svobodová, J. Albrechtová, L. Kumstýřová, M. Vaňková and Z. Vondrák. 2000. Carbohydrate status during somatic embryo maturation in Norway spruce. *In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant* 36:260-267.

Litz, R.E. and D. J. Gray. 1992. Organogenesis and somatic embryogenesis. In: Hammerschlag F.A. and Litz R.E. (eds.), *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*, CAB International, UK, University Press, Cambridge, 3-34.

Liu, C. M., Z. H. Xu. and N. H. Chua. 1993. Auxin Polar Transport is Essential for the Establishment of Bilateral Symmetry during Early Plant Embryogenesis. *The Plant Cell* 5: 621-630.

López-Salvador, G., C. A. Vidal-Corona, A. Gómez-Salazar, G. Ortiz-Sarabia, G. Ortiz-Rivera. y F. Hernández-Santiago. 2011. Valoración de diferentes sustratos en la propagación por estacas de linaloe (*Bursera linanoe*). 5to. Congreso Forestal de Cuba.

- Lu, Z., M. Huang., D. P. Ge., Y. H. Yang., X. N. Cai., P. Qin. and J. M. She. 2003. Effect of brassinolide on callus growth and regeneration in *Spartina patens* (Poaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 87-89.
- Machakova, I., E. Zazimalova. and E.F. George. 2008. Plant Growth Regulators I: induction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. Plant Growth Regulators III: Gibberelins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. *In: George, E .F., Hall, M.A. and de Klerk, G-J* (eds). *Plant propagation by tissue culture*. Chapter 5. 3 ed. The Netherlands: Springer, 175-204.
- Malgorzata, D. G. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, *Plant Growth Regulation*. 43: 27-47.
- Martínez-Ruiz, R., H. S. Azpíroz-Rivero., J. L. Rodríguez-De La O., V. M. Cetina A. y M. A. Gutiérrez E. 2005. Aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake Y *Eucalyptus grandis* Hill EX Maidenr. *RA Ximhai* 1 (3): 591-597.
- Mathews, H. and H. Y. Wetzstein. 1993. A revised protocol for efficient regeneration of somatic embryos and acclimatization of plantlets in pecan, *Carya illinoensis*. *Plant Science* 91 (1): 103-108.
- Merkle, S, W. A. Parrot. and B. S Flinn. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. *En: Thorpe TA (ed) In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 155-203.

- Michler, C. H. 1995. Somatic embryogenesis in *Populus* spp. *In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants Forestry Sciences* , S. Mohan Jain, Pramod K. Gupta, Ronald J. Newton, Vol. 44-46: 89-97.
- Mitchell, J. W., N. Mandava., J. F. Worley., J. R. Plimmer. and M. V. Smith. 1970. Brassins--a New Family of Plant Hormones From Rape Pollen. *Nature* (225): 1065-1066.
- Montero-Cortés, C., L Sáenz., I. Córdova., A. Quiroz., J. L. Verdeil. and C. Oropeza. 2010. GA3 stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a KNOTTED-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.). *Plant Cell Reports* 29:1049-1059.
- Moshkov, I E., G.V. Novikova., M.A. Hall. and E.F. George. 2008. Plant Growth Regulators III: Gibberelins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. *In: George, E .F., Hall, M.A. and de Klerk, G-J (eds). Plant propagation by tissue culture. Chapter 7. 3 ed. The Netherlands: Springer, 227-281.*
- Murashige, T. and Skoog, F. A. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Nagmani, R. and Bonga J.M. 1985. Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. *Canadian Journal of Forest Research* 15:1088-1091.
- Nargaraja, C., and A. A. Farooqi. 1989. Studies on the seed germination as influenced by various pretreatments in *Bursera*. *Indian Perfumer* 33: 48-53.

- Nava J., J. F., A. R. Jiménez-Aparicio., A. De Jesús-Sánchez., M. L. Arenas O., E. Ventura-Zapata. y S. Evangelista-Lozano. 2011. Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *laelia eyermaniana* rchb. f. generadas *in vitro* Núm. Polibotánica 32: 107-117.
- Norgaard, J. V. 1997. Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* L. Journal of Plant Science 124: 211-221.
- Núñez, M. W.J. Siqueira., M. Hernández., M.A.T. Zullo., C. Robaina., and F. Coll. 2004. Effect of spirostane analogues of brassinosteroids on callus formation and plant regeneration in lettuce (*Lactuca sativa*). Plant Cell Tissue and Organ Culture 78: 97-99.
- Oishi, M. Y. and J. D. Bewley. 1990. Distinction between the Responses of Developing Maize Kernels to Fluridone and Desiccation in Relation to Germinability, α -Amylase Activity, and Abscisic Acid Content Plant Physiolt. 94(2): 592-598.
- Ortiz-Pulido, R. and N. P. Pavón. 2010. Influence of slope orientation on sex ratio and size distribution in a dioecious plant *Bursera fagaroides* var. *purpusii* (Brandeg.) McVaugh and Rzed. (Burseraceae). Plant Ecology 208: 271-277.
- Palhares G., A., R. Rodriguez, M. Cid., D. Pina. y J.L. Gonzalez-Olmedo. 2004. Efecto de un análogo de brasinoesteroides (MH5) en la propagación de *Eucalyptus urograndis* en biorreactores de inmersión temporal. Cultivos tropicales. 25 (1): 39-44.

- Pan, M. J. and J. van Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture. *Plant Growth Regulation* 26: 155-163.
- Pasternak, P. T., E. Prinsen., F. Ayaydin., P. Miskolczi., G. Potters., H. Asard., Harry A. Van Onckelen., D. Dudits. and A. Fehér. 2002. The Role of Auxin, pH, and Stress in the Activation of Embryogenic Cell Division in Leaf Protoplast-Derived Cells of Alfalfa. *Plant Physiology* 129: 1807-1819.
- Pearce, D., R. P. Pharis., K. Rajasekaran. and M. G. Mullins. 1987. Effects of chilling and ABA on [3H] gibberellin A4 metabolism in somatic embryos of grape. *Plant Physiology* 80: 381-385.
- Pierik, R. L. M. 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Plata, E. and A. M. Vieitez. 1990. *In vitro* regeneration of *CameUia reticulata* by somatic embryogenesis. *Journal Horticulturae Science* 65 (6):707-714.
- Polito, S. V., G. McGranahan., K. Pinney. and L. Charles. 1989. Dirigin of somatic embryos from repetitively embryogenesis cultures of walnut (*Juglans regia* L.): implications for agrobacterium-mediated Transformation. *Plant cell Reports* 8 (4): 219-221.
- Pospíšilová, J., I. Tichá., P. Kadleček., D. Haisel. and Š. Plzáková. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum*. 42 (4): 481-497.

- Pullman, G. S., P. K. Gupta., R. Timmis., C. Carpenter., M. Kreitinger. and E. Welty. 2005. Improved Norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbón. *Plant Cell Reports* 24: 271–279.
- Pullman, G. S., Y. Zhan. and B. H. Phan. 2003. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Reports* 22:96-104.
- Purata S., M. Chibnik., B. Brosi. and A. M. López. 2004. Figuras de madera de *Bursera* en Oaxaca, México. *In*: Miguel Alexiades and Shanley Patricia (eds.), *Productos forestales, medios de subsistencia y conservación: Estudios de caso sobre diversos sistemas de manejo de productos forestales no maderables. Volumen 1 Latino America*. Bogor, Indonesia: Center for International Forestry Research (CIFOR) p 415-437.
- Raemakers, C.J.J.M., Amati, M., Staritsky, G., E Jacobsen. and R.G.F. Visser. 1991. Primary and secondary somatic embryogenesis in cassava. *Acta Botanica Neerlandica* 40:239-240.
- Raemakers, C.J.J.M., E. Jacobsen. and R.G.F. Visser. 1995. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81: 93-107.
- Raemakers, C.J.J.M, E. Jacobsen. and R. G. F. Visser. 1999. Direct cyclic somatic embryogenesis of cassava for mass production purposes. *In*: *Plant Cell Culture Protocols* 111:61-70.

- Rao, S.S. R., B. V. Vardhini., E. Sujatha. and S. Anuradha. 2002. Brassinosteroids. A new class of phytohormones. *Current Science* 82 (10): 1239-1245.
- Rao, P.S. 1965. *In vitro* induction of embryonal proliferation in *Santalum album* (L.) *Phytomorphology* 15: 175-179.
- Reinert, J. 1959. Uber die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen in gewebeulturen aus karotten. *Planta* 53: 318-333.
- Robichaud, R. L., V. C. Lessard. and S. A. Merkle. 2004. Treatments affecting maturation and germination of American chestnut somatic embryos. *Journal of Plant Physiology* 161: 957-969.
- Rodríguez R., M. Escalona., Y. Rodríguez., M. Cid. y J. L. González-Olmedo. 2000. Aclimatización de plántulas de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) provenientes de sistemas de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales* 21 (3): 51-56.
- Ruzin, SE. 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford, New York: Oxford University Press. 322 p.
- Rzedowski, J. y H. Kruse. 1979. Algunas tendencias evolutivas en *Bursera* (Burseraceae). *Taxon* 28: 103-116.
- Rzedowski, J., R. Medina L. y G. Calderón de Rzedowski. 2004. Las especies de *Bursera* (Burseraceae) en la cuenca superior del rio Papaloapan (México). *Acta Botánica Mexicana* 66: 23-151.

- Rzedowski, J. L. Medina. y G. Calderón de Rzedowski. 2005. Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera* (Burseraceae). *Acta Botánica Mexicana* 70: 85-111.
- Sallanon, H., Tort, M. and Coudret, A. 1993. The ultrastructure of micropopagated and greenhouse rose plant stomata. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32 (2): 227-233.
- Sánchez-Enciso, M.C., J. L. Rodríguez de la O., G. P. Zárate de Lara., A. López H., S. Barrales D. y G. González de la Cruz. 2005. Embriogénesis somática en papa cvs. Atlantic y fritolay-1867. *Revista Chapingo Serie horticultura* 2: 219-224.
- Sánchez-Romero, C., B.Márquez-Martín. and F. Pliego-Alfaro. 2005. Somatic and Zygotic Embryogenesis in Avocado. *Plant Cell Monographs* (2): 271-284.
- San Jose, M.C. and A. M. Vieitez. 1993. Regeneration of camellia plantlets from explant cultures. *Horticulturae* 54: 303-315.
- Santana N., S. Cortés., J.V. Martín. y S. Montes. 1996. Adaptación de vitroplantas de embriones somáticos de cafeto (*C. arabica* L.) variedad catimor (9722). *Cultivos tropicales* 17 (2): 83-85.
- SAS Institute. 2002. The SAS system for windows. Release 6.1. SAS Institute., Cary, NC.

- Schumann, G., U. Ryschka., J. Schulze. and E. Klocke. 1995. Anatomy of Somatic Embryogenesis. En: Bajaj YPS (Ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry 20. Somatic Embryogenesis and Synthetuc Seed, pp. 71-101. Kluwer Academic Publisher, Dordrech.
- Smith, D. R., A.P Singh. and L. Wilton. 1985. Zygotic embryos of *Pinus radiata* *in vivo* and *in vitro*. En: Smith DR (ed). Proceedings International Conifer Tissue Culture Work Group. Forest Research Institute, New Zealand Forest Service, Rotoura, New Zealand, p. 21.
- Solares-Arenas, F., E. Cruz-Cruz., M. Gómez-Cárdenas., D. Vargas-Álvarez., A. Borja de la Rosa., V. Mariles-Flores., V. Serrano-Altamirano., M. E. Fuentes-López., S. Orozco-Cirilo., J. F. Castellanos-Bolaños. Y D. Ayerde-Lozada. 2009. El proceso de extracción de aceite de linaloe (*Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón y Medina) en los estados de Morelos y Guerrero pp 177-196. *In*: E. Cruz-Cruz., V. Mariles-Flores., M. Gómez-Cárdenas. y D. Vargas-Álvarez (eds.). Fundamentos técnicos para el manejo de poblaciones naturales de linaloe (*Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón y Medina) en México. Libro técnico No. 14. INIFAP. Valles Centrales Oaxaca 177-196.
- Stasolla, C, L. Kong., E. C. Yeung. and T. A. Thorpe. 2002. Maturation of somatic embryogenesis in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant* 38: 93-105.

- Stasolla, C., L. van Zyl., U. Egertsdotter., D. Craig., W. Liu. and R. R. Sederoff. 2003. The Effects of Polyethylene Glycol on Gene Expression of Developing White Spruce Somatic Embryos. *Plant Physiology* 131: 49-60.
- Stasolla, C. and E. C. Yeung. 2003. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 15-35.
- Steward, F. C. 1958. Growth and organized development of cultured cells. III. Interpretations of the growth from free cells to carrot plant. *American Journal of Botany* 45: 709-713.
- Thomas, T. L. 1993. Gene expression during plant embryogenesis and germination: An overview. *Plant Cell* 5: 1401-1410.
- Thompson, M. R., T. J. Douglas., H. Obata-Sasamoto. and T. A. Thorpe. 1986. Mannitol metabolism in cultured plant cells. *Physiologia Plantarum* 67 (3): 365-369.
- Trewavas, A.J. 1981. How do plant growth substances work?. *Plant Cell and Environment* 4: 203-28.
- Vega, A. y D. Prehn. 2005. Inducción e Inicio de Maduración *In vitro* de Tejido Embriogénico de *Quillaja saponaria*. *Ciencia e Investigación Agraria* 32 (3): 197-207.

- Vieitez, A. M. and J. Barciela. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryonic tissues of *Camellia japonica* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21 (3): 267-274.
- Vieitez, F. J. 1995. Somatic embryogenesis in chestnut. In: Jain MS, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants vol 2*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 375-407.
- Vieitez, F. J. and S. A. Merkle. 2005. *Castanea* spp. Chestnut. In: Litz RE (ed) *Biotechnology of fruit and nut crops*. CAB International, Wallingford, UK, 265-296.
- Viñas, M. y V. M. Jiménez 2011. Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (Arecaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología* 13 (2): 229-242.
- von Arnold S., I. Sabala., P. Bozhkov., J. Dyachok. and L. Filonova. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 233-249.
- von Arnold, S. 2008. Somatic embryogenesis. In: George, E .F., Hall, M.A. and de Klerk, G-J (eds). *Plant propagation by tissue culture*. Chapter 9. 3 ed. The Netherlands: Springer, 335-354.
- Wilmer, C. and M. Fricker. 1996. *Stomata* (2nd edition), Chapman & Hall, London. 385 p.

- Witjaksono, L. and R. E. Litz. 1999. Maturation of avocado somatic embryos and plant recovery. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 141-148.
- Yang, L., J. Wang., L. Bian., Yuhua L. and H. Shen. 2012. Cyclic secondary somatic embryogenesis and efficient plant regeneration in mountain ash (*Sorbus pohuashanensis*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 111 (2): 173-182.
- Yeung, E. C., M. H. Rahman. and T. A. Thorpe. 1996. Comparative development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. Cv. Topas. I. Histodifferentiation. *International Journal of Plant Science* 157: 27-39.
- Yeung, E.C. 1995. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. *In: Thorpe, T.A. (Ed.) In vitro embryogenesis in plants.* Dordrecht, Kluwer Academic Pub p. 205-247.
- Zacaría, L. 1993. Etileno. *In: J. Azcon-Bieto y M. Talon (eds). Fisiología y Bioquímica Vegetal.* Interamericana McGraw-Hill. Madrid, 343-356.