



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO FORESTAL

**PRODUCCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE *Bursera linanoe* (La Llave)
Rzed., Calderón & Medina, EN BIORREACTORES DE SISTEMA DE INMERSIÓN
TEMPORAL**

ISAAC VAZQUEZ CISNEROS

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

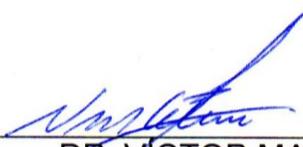
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

La presente tesis, titulada: **Producción de embriones somáticos de *Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón y Medina en biorreactores de sistema de inmersión temporal**, realizada por el alumno: **Isaac Vazquez Cisneros**, 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. VÍCTOR MANUEL CETINA ALCALÁ

DIRECTOR DE TESIS:



DR. GREGORIO ARELLANO OSTOA

ASESOR:



DR. EDUARDO GARCÍA VILLANUEVA

ASESOR:



DR. EUGENIO SÁNCHEZ ARREOLA

PRODUCCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE *Bursera linanoe* (La Llave)
Rzed., Calderón & Medina, EN BIORREACTORES DE SISTEMA DE INMERSIÓN
TEMPORAL

Isaac Vazquez Cisneros, MC.

Colegio de Postgraduados, 2014

El linaloe es un árbol conocido por su aroma agradable; la madera se utiliza para fabricar artesanías, y los frutos para extracción de aceite esencial, sin embargo, su aprovechamiento ha sido descontrolado y no existe manejo forestal para esta especie, lo cual reduce la población natural. Se plantea mejorar la metodología de embriogénesis somática tradicional mediante un sistema de inmersión temporal, así mismo, evidenciar el proceso embriogénico indirecto y secundario, finalmente comprobar la producción de metabolitos secundarios de interés. Se utilizó la línea embriogénica LEL 61-4, y un medio de cultivo base MS complementado con 30 g L⁻¹ sacarosa, 0.022 μM bencil adenina y 0.027 μM ácido naftalenacético, con temperatura de 25 ± 2 °C y fotoperiodo de 16 h, provista por diodos emisores de luz azul, blanca y roja. Inicialmente los resultados respecto al uso de los tipos de luz y los sistemas de cultivo lograron generar un incremento significativo en biomasa. Las fotomicrografías demostraron el proceso embriogénico indirecto y secundario, desde sus primeros inicios y se demostró la síntesis de linalol y acetato de linalol. Se aportó un protocolo de producción más eficiente con el uso del sistema de inmersión temporal, reduciendo costos, espacio y tiempo de producción.

Palabras clave: Linaloe, Burseraceae, sistema de inmersión temporal, calidad de luz, embriogénesis somática.

ABSTRACT

Linaloe is a tree that is well-known for its pleasant aroma. Wood from this tree is used for handcrafts, and its fruits are used for the extraction of essential oils; however, use of this resource has been uncontrolled, and there is no forestry management for the species. This reduces the natural populations. In this work we propose to improve the traditional somatic embryogenesis methodology through a temporary immersion system; also to evidence the indirect and secondary embryogenic processes; and finally to test the production of secondary metabolites of interest. The LEL 61-4 embryogenic line was used with a MS base growth medium supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose, 0.022 μM benzyl adenine, and 0.027 μM naphthaleneacetic acid, at a temperature of 25 ± 2 °C, and a 16 h photoperiod, using blue, white, and red light emitting diodes. Initially, according to the results regarding the use of the different types of light and the growth systems, a significant biomass increase was achieved. The photomicrographs proved the indirect and secondary embryogenic processes from their start, and the synthesis of linalol and linalool acetate were proven. A more efficient production protocol was supplied with the use of the temporary immersion system, reducing production costs, space, and time.

Keywords: Linaloe, Burseraceae, temporary immersion system, light type, somatic embryogenesis.

AGRADECIMIENTOS

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

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo por haberme brindado las herramientas y conocimientos necesarios para desarrollar mi trabajo de investigación.

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. Víctor Manuel Cetina Alcalá, que gracias a su entrega para la realización de este estudio y por su amistad.

Al Dr. Gregorio Arellano Ostoia, por la dedicación, el tiempo y el apoyo que me ha brindado y de igual manera por su amistad.

Al Dr. Eduardo García Villanueva, por su tiempo y sabiduría expresada en el proceso del trabajo de investigación.

Al Dr. Eugenio Sánchez Arreola, por aportar su conocimiento que contribuyo para poder culminar este trabajo.

Dedicatoria

A mi familia por su apoyo incondicional, antes y durante el desarrollo de mis estudios de maestría y por haberme guiado hasta este momento de mi vida, de todo corazón muchas gracias.

A mis amigos que me ayudaron de una u otra forma a desarrollar y concluir esta etapa de mi vida.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVO.....	3
1.1.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1 Descripción botánica.....	5
2.2 Posición taxonómica.....	5
2.3 Propagación por semilla de linaloe.....	6
2.4 Propagación por estacas de linaloe.....	6
2.5 Propagación <i>in vitro</i> de linaloe.....	6
2.6 Embriogénesis en angiospermas	7
2.7 Embriogénesis somática.....	8
2.7.1 Inducción y desarrollo.....	8
2.7.2 Directa.....	9
2.7.3 Indirecta.....	9
2.7.4 Secundaria.....	9
2.7.5 Estudios anatómicos.....	10
2.7.6 Medios de cultivo utilizados en la embriogénesis somática..	10
2.7.7 Antecedentes en especies forestales.....	10
2.7.8 Embriogénesis somática en <i>Bursera</i>	11
2.8 Efecto del tipo de luz en la morfogénesis.....	11
2.9 Producción de metabolitos secundarios <i>in vitro</i>	12
2.10 Usos de linalol y acetato de linalol.....	12

2.11	Sistema de cultivo en medio líquido.....	13
2.12	Sistemas de inmersión temporal.....	14
2.12.1	Limitantes de los sistemas de cultivo de inmersión temporal.....	14
2.13	Sistemas estacionarios.....	15
2.14	Sistemas en agitación.....	15
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1	Localización del experimento.....	16
3.2	Material vegetal.....	16
3.3	Medio de cultivo base.....	16
3.4	Medios de cultivo para la germinación de embriones somáticos.....	17
3.5	Condiciones de incubación.....	17
3.6	Experimento 1. Producción de embriones somáticos y cálculo de índice de crecimiento en sistema de inmersión temporal y sistema tradicional.....	18
3.7	Experimento 2. Germinación de embriones somáticos en el sistema de inmersión temporal y tipo de luz roja.....	19
3.8	Experimento 3. Germinación de embriones somáticos en medio semisólido.....	19
3.9	Microtécnica para cortes anatómicos en embriones somáticos y masas pro-embriogénicas.....	20
3.9.1	Selección de muestras.....	20
3.9.2	Fijación.....	20

3.9.3	Empaquetado de material vegetal.....	21
3.9.4	Deshidratación.....	21
3.9.5	Infiltración.....	21
3.9.6	Inclusión.....	21
3.9.7	Formación del bloque y corte.....	21
3.9.8	Desparafinado.....	22
3.9.9	Secuencia de hidratación.....	22
3.10	Extracción por reflujo de linalol y acetato de linalol a partir de embriones somáticos producidos en sistema de inmersión temporal y sistema tradicional.....	23
3.10.1	Cuantificación de linalol y acetato de linalol por medio de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC).....	24
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1	Producción de embriones somáticos en el sistema de inmersión temporal y sistema tradicional.....	27
4.2	Índice de crecimiento.....	41
4.3	Germinación de embriones somáticos en el sistema de inmersión temporal y tipo de luz roja.....	43
4.4	Germinación de embriones somáticos en medio semisólido	47
4.5	Embriogénesis secundaria.....	49
4.6	Masa proembriogénica.....	52
4.7	Meristemo apical.....	57
4.8	Extracción y cuantificación por reflujo de linalol y acetato de linalol por medio de cromatografía de líquidos a alta	

	presión (HPLC).....	60
5.	CONCLUSIONES.....	69
6.	LITERATURA CITADA.....	71

LISTA DE CUADROS

	Pagina
Cuadro 1. Número de embriones somáticos en cada una de las etapas de desarrollo, en el sistema de inmersión temporal y sistema tradicional.....	29
Cuadro 2. Número de embriones somáticos en cada una de las etapas de desarrollo, en los tres tipos de luz.....	33
Cuadro 3. Número de embriones somáticos en cada una de las etapas de desarrollo en combinación con diferentes tipos de luz en el sistema de inmersión temporal y sistema tradicional con agar.....	39
Cuadro 4. Peso fresco e índice de crecimiento del material vegetal en el sistema de inmersión temporal y el sistema tradicional.....	42
Cuadro 5. Porcentaje de embriones cotiledonares con cambios de tipos de luz y del medio de cultivo.....	48
Cuadro 6. Datos de la extracción de aceite de embriones y masas proembriogénicas de linaloe a reflujo.....	60
Cuadro 7. Porcentaje de la extracción a reflujo de linalol y acetato de linalol, en combinación con distintos tipos de luz.....	66

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Cuarto de incubación con recipientes de inmersión temporal y tipos de luz.....	17
Figura 2. Material vegetal macerado y sometido a extracción a reflujo con hexano.....	24
Figura 3. Sistema de inmersión temporal (RITA®).....	28
Figura 4. Sistema tradicional con agar.....	28
Figura 5. Embrión cotiledonar, torpedo y globular obtenidos en el sistema de inmersión temporal.....	32
Figura 6. Número total de embriones somáticos producidos en diferentes etapas de desarrollo en el sistema de inmersión temporal y el sistema tradicional en las distintos tipos de luz.....	37
Figura 7. Porcentaje de la formación de cotiledones y raíz de embriones cotiledonares producidos en el sistema de inmersión temporal y luz roja.....	44
Figura 8. Porcentaje de la condición de embriones somáticos cotiledonares producidos en el sistema de inmersión temporal y luz roja.....	44
Figura 9. Embriones somáticos deformes o anómalos.....	45
Figura 10. Embrión cotiledonar bien formado.....	45
Figura 11. Porcentaje de embriones cotiledonares por categorías longitudinales producidos en el sistema de inmersión temporal y luz roja.....	46

Figura 12.	Embriogénesis somática secundaria.....	50
Figura 13.	Nódulos meristemáticos de embriogénesis secundaria en el hipocótilo de un embrión cotiledonar.....	51
Figura 14.	Embriogénesis indirecta, inicio de embriones globulares.....	53
Figura 15.	Embrión pre-globular.....	54
Figura 16.	Embrión acorazonado1.....	54
Figura 17.	Embrión acorazonado2.....	55
Figura 18.	Embrión entre globular y torpedo.....	55
Figura 19.	Embrión en estado de torpedo inicial.....	56
Figura 20.	Meristemo apical de un embrión somático.....	58
Figura 21.	Meristemo apical de una planta adulta de linaloe.....	58
Figura 22.	Cromatograma de la esencia de linalol y acetato de linalol de masas proembriogénicas y embriones somáticos producidos en el sistema tradicional y luz blanca fluorescente.....	61
Figura 23.	Cromatograma de la esencia de linalol y acetato de linalol de masas proembriogénicas y embriones somáticos producidos en el sistema de inmersión temporal y tipo de luz roja.....	62
Figura 24.	Cromatograma de la esencia de linalol y acetato de linalol de masas proembriogénicas y embriones somáticos producidos en el sistema de inmersión temporal y tipo de luz azul.....	62
Figura 25.	Cromatograma de la esencia de linalol y acetato de	

	linalol de masas proembriogénicas y embriones somáticos producidos en el sistema de inmersión temporal y tipo de luz blanca.....	63
Figura 26.	Curva de calibración de linalol.....	64
Figura 27.	Curva de calibración de acetato de linalol.....	64

1. INTRODUCCIÓN

El linaloe es un árbol de la familia Burseraceae, originaria de América, esta familia tiene más de un centenar de especies de plantas leñosas cuya distribución se confina al continente americano, desde el suroeste y sureste de los Estados Unidos hasta el norte de Perú y Brasil incluye las Antillas y las Galápagos. La mayor diversidad se encuentra en México donde actualmente se han identificado 80 especies, específicamente se distribuyen en la vertiente del pacífico de la república con su máxima concentración en la cuenca del Balsas (Rzedowski *et al.*, 2005).

Bursera linanoe (La Llave) Rzed., Calderón & Medina (Linaloe) es un árbol endémico de México, su distribución abarca los estados de Guerrero, Michoacán, Oaxaca y Puebla, la importancia económica de esta especie radica en la obtención de aceites esenciales para la industria de la perfumería, farmacéutica, y la fabricación de artesanías (cajas labradas y laqueadas) a partir de la madera, misma que es ampliamente utilizada en la región de Olinalá Guerrero (Redowski *et al.*, 2004) dicha actividad sustenta la principal fuente de ingresos en la región. La obtención de aceite se obtiene por destilación de la madera y de los frutos, e implica la remoción del árbol o la colecta de gran cantidad de frutos (Espinoza, 2006). Esta actividad hasta el momento se realiza de manera ilegal y ha llevado a su desaparición en amplias áreas de la región Mixteca, de Guerrero y Oaxaca. (Jiménez, 2008).

El aceite es conocido mundialmente por su aroma cítrico, por lo que se exportó de forma intensiva a Europa durante el siglo XIX y principios del XX (Rzedowski *et al.*, 2004), en México la extracción del aceite se sigue haciendo de forma artesanal (Toledo, 1982). La madera ha sido utilizada para la fabricación de

artesanías, ambos productos se hacen a partir de material nativo, esto explica la notable reducción de la especie en su hábitat natural. (Rzedowski *et al.*, 2004).

En este estudio se trabajó con la embriogénesis somática, como una importante vía de propagación (Ibaraki y Kurata, 2001) mejoramiento genético (Aguilar *et al.*, 2008), conservación (Celestino *et al.*, 2005), y producción de metabolitos secundarios (Kumar *et al.*, 2004) a través de material seleccionado en campo, intentando con ello el disminuir la presión ecológica que se tiene sobre esta especie.

El mantenimiento de la embriogénesis somática implica gran cantidad de mano de obra, costos elevados y espacio para albergar al material vegetal. La automatización por medio de un sistema de inmersión temporal reduce estas limitantes (Aguilar *et al.*, 2008). Es por ello que este trabajo plantea la metodología de embriogénesis somática tradicional mediante un sistema de inmersión temporal el cual mejora la proliferación de embriones somáticos debido al período y la frecuencia de inmersión que inciden de manera favorable en la proliferación y diferenciación de los embriones somáticos, a través del control de la absorción de nutrientes, agua y la remoción constante de la atmósfera, esto da como resultado beneficios en la fisiología del material vegetal y uniformidad del mismo (Etienne y Berthouly, 2002). La aplicación de estos sistemas en el género *Bursera* no se ha reportado aún, lo cual abre la posibilidad de investigar sobre ella.

El presente estudio plantea evaluar el número de embriones somáticos generados así como las etapas de desarrollo de los mismos, al ser utilizado el recipiente de inmersión temporal automatizado RITA® (CIRAD, Montpellier, Francia) comparándolo con el sistema tradicional con agar. Todo ello influenciado por distintas calidades de luz tipo LED (Diodos Emisores de Luz).

1.1 Objetivo general

Incorporar la tecnología de los sistemas de inmersión temporal en la propagación clonal masiva de Linaloe (que permite aumentar la eficiencia de la multiplicación de embriones somáticos y disminuir los costos de producción de plantas producidas por el sistema de embriogénesis somática tradicional), implementando el sistema de inmersión temporal tipo RITA[®], para mantener la inducción y diferenciación de los embriones somáticos a partir de embriogénesis secundaria.

1.2 Objetivos particulares

- Ejecutar los experimentos relacionados para la inducción y el mantenimiento del callo embriogénico por tipo de explante, evaluar el efecto de reguladores de crecimiento en diferentes medios de cultivo, en los sistemas de inmersión temporal y embriogénesis somática tradicional.
- Evaluar diferentes medios de cultivo, para la inducción de embriogénesis secundaria en la embriogénesis somática tradicional y en el sistema de inmersión temporal.
- Evaluar el efecto del tipo de luz emitida por lámpara Fluorescente y Diodos Emisores de Luz azul, blanco y rojo.
- Generar el protocolo para la multiplicación masiva de embriones somáticos, por medio de embriogénesis secundaria en sistema de inmersión temporal.
- Efectuar los estudios anatómicos del proceso de proliferación y diferenciación de los embriones somáticos, así como la actividad meristemática de los mismos.

- Evaluar la síntesis de linalol y el acetato de linalol durante la embriogénesis somática secundaria en el sistema de inmersión temporal.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Descripción Botánica

Bursera linanoe (La Llave) Rzed., Calderón & Medina (Linaloe) es un árbol dioico de hasta de 8 (10) m de alto, tronco de hasta 60 cm. de diámetro con corteza gris-rojiza no exfoliante. Hojas compuestas de 3 a 7 foliolos, en ocasiones hasta 11 de ellos, foliolos elípticos, lanceolados u oblongos, toscamente aserrados en el margen, con venación prominente en el envés. Florece en mayo y a principios de julio, carece de follaje de noviembre a mayo. Presenta inflorescencias racimopaniculadas, hasta de 6 a 8 cm. de largo y hasta con 35 flores. Su infrutescencia presenta hasta 8 frutos pocas veces están solitarios, son bivalvados, ovoides, de 9 a 11 mm. de largo y 8 mm. de ancho, rojizos en la madurez. Habita generalmente en el bosque tropical caducifolio y en algunos matorrales xerófilos en altitudes que van de los 650 a los 1500 m. (Rzdowzki *et al.*, 2004).

2.2 Posición taxonómica

Reino: Plantae.

División: Magnoliophyta.

Subclase: Rosidae.

Orden: Sapindales.

Familia: Burseraceae.

Género: *Bursera*.

Especie: *Bursera linanoe*

Nombre científico: *Bursera linanoe* (La Llave) Rzed, Calderón & Medina.

2.3 Propagación por semilla de linaloe

Existen pocos trabajos publicados sobre la propagación de *Bursera* en México y sólo es posible obtener información empírica sobre la propagación vegetativa de algunas especies de importancia económica (Rzedowski *et al.*, 2005). La propagación por semilla es compleja, posiblemente la endogamia esté detrás del problema de semillas vanas o el bajo porcentaje de germinación (Menges, 1991; Chacoff *et al.*, 2004). Además, se ve afectada por el pastoreo y requerimiento de condiciones ambientales específicas como; temperatura fluctuante y disponibilidad de agua principalmente (Bonfil *et al.*, 2008).

2.4 Propagación por estacas de linaloe

Hay pocos estudios disponibles sobre su propagación, ésta es limitada por la baja producción de raíces adventicias, en el mejor de los casos, o la producción de callo, lo que limita un óptimo desarrollo de la planta. La producción de raíces en estacas de *Bursera* es restringido por el uso de estacas muy grandes o muy pequeñas que tienden a pudrirse o a formar callo, por lo que hace falta realizar ensayos con diferentes sustratos y cuidar los componentes abióticos como la humedad relativa y la temperatura, así como, probar distintas concentraciones de AIB y fecha de recolección. (Bonfil *et al.*, 2007).

2.5 Propagación *in vitro* de linaloe

Recientemente se han divulgado los resultados obtenidos acerca de la capacidad morfogénica que tiene el linaloe *in vitro*, utilizando frutos colectados de plantas femeninas en el verano de 2008, en los estados de Puebla, Oaxaca y Guerrero. Para la inducción de embriones somáticos a partir de los árboles

previamente seleccionados por tipo de uso (maderable y/o industrial), se utilizaron específicamente las semillas, mismas que se les dio un tratamiento para su desinfección y posteriormente colocarlas en un medio de cultivo para promover la germinación, la cual ocurrió entre los 30 y 45 días en oscuridad. La inducción de la línea embriogénica LEL 61-4, se obtuvo a partir de cotiledones y hojas en expansión de las semillas. Se colocaron tres explantes, (secciones de hojas jóvenes, cotiledones y entrenudos de plántulas germinadas *in vitro*) en medio MS suplementado con 21.48 μM de ácido naftalén acético (ANA), 2.22 μM de bencilamino purina (BAP) y 500 mg L^{-1} de caseína hidrolizada. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de oscuridad a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante nueve semanas. Después los explantes se transfirieron a un medio similar, reduciendo la concentración de ANA a 0.54 μM y el BAP a 0.44 μM , con un fotoperiodo de 16 h y una temperatura de $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente los explantes con cayo embriogénico en formación se mantuvieron con subcultivos cada 4 semanas (Arellano-Ostoa *et al.*, 2009a).

2.6 Embriogénesis en angiospermas

El desarrollo del embrión envuelve divisiones, alargamiento, diferenciación y organización o especialización celular (Esau, 1965), es decir una serie de procesos fisiológicos que lo conducen a la formación del embrión, este a su vez pasará a través de las fases de globo, corazón, torpedo y cotiledonar (Bidwell, 1979). El proceso embriogénico comienza con divisiones asimétricas para establecer la polaridad del embrión (Alberts *et al.*, 1989), pero estas se desarrollan dependiendo de condiciones ambientales (Bhojwani y Bhatnagar, 1999).

También se da el desarrollo de células vacuoladas que formaran el suspensor, este proveerá al embrión de nutrientes del endospermo formado durante la fecundación. Las células del embrión diploide proliferan para formar el meristemo apical y de la raíz, estos dos definen el eje principal de la planta, subsecuentemente el embrión se elonga, y el cámbium vascular es formado para proveer el tejido de transporte entre la raíz y el ápice (Alberts *et al.*, 1989)

2.7 Embriogénesis somática

Parte de células totipotentes, estas son células de una planta que pueden generar un individuo nuevo (Verdeil *et al.*, 2007), debido a las condiciones adecuadas que reciben, lo cual desencadena cambios morfológicos y bioquímicos. Si bien es cierto no todas las células tienen esta capacidad, esto no quiere decir que pierdan la información, si no que la capacidad para usar esa información es la que se pierde (Bidwell, 1979).

La embriogénesis somática posibilita formar miles de embriones en corto periodo y ofrece la oportunidad de generar plantas a escala comercial (Bhojwani y Bhatnagar, 1999), es así que el embrión somático es una estructura bipolar (raíz/ápice) similar a un embrión cigótico, pero en este no actúa una fusión de gametos (Segura, 1993).

2.7.1 Inducción y desarrollo

Se divide en cuatro fases. En la fase 0 la cual parte de células competentes que a su vez forman masas proembriogénicas en presencia de auxinas, y adquieren el potencial para formar embriones lo que lleva a la fase 1, en ésta los agregados celulares pasan a un medio de cultivo sin auxina, y se promueve una activación de

la división celular, eso conlleva a la formación del embrión en estado globular, fase 2, a partir de la cual se comenzarán a desarrollar los siguientes estados de la embriogénesis fase 3 (corazón torpedo y cotiledonar) (Segura, 1993).

2.7.2 Directa

Es el origen de embriones somáticos directamente del explante original, (cotiledones, hojas, tallos, raíces, anteras etc.). En este proceso no existe proliferación de tejido desorganizado (Segura, 1993), es decir, existen células proembriogénicas que están presentes y listas para su expresión que se da en condiciones favorables. (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006)

2.7.3 Indirecta

Es la formación previa de un cúmulo de células llamado callo (Segura, 1993), éste es un tejido amorfo mismo que alberga células capaces de generar un embrión somático, siempre y cuando se den las condiciones ambientales y nutrimentales para ello. En este tipo de embriogénesis ocurren las mismas fases de crecimiento que en un embrión cigótico. La formación del embrión somático responde a estímulos hormonales principalmente a altas concentraciones de auxinas (Alberts *et al.*, 1989).

2.7.4 Secundaria

Es el término utilizado para llamar a los embriones formados a partir de un embrión individual ya formado o embrión primario, esta se desarrolla principalmente en cotiledones e hipocótilo, directamente de células epidérmicas y subepidérmicas,

en cualquiera de los casos anteriores la embriogénesis somática puede generarse a partir de una o varias células (Bhojwani y Bhatnagar, 1999).

2.7.5 Estudios anatómicos

Los estudios anatómicos de la embriogénesis somática consideran su procesamiento en el laboratorio, para evidenciar la formación directa o indirecta, así como, el origen uni o multicelular del embrión, con ello se pretende mostrar el subsecuente desarrollo y los distintos estados de desarrollo de los embriones.

El uso de fotomicrografías para cuantificar cambios asociados al proceso embriogénico, es la vía de análisis adecuada para observar cambios puntuales y específicos (Berlyn y Miksche, 1977).

2.7.6 Medios de cultivo utilizados en la embriogénesis somática

Existe una gran variedad de medios de cultivo utilizados en la embriogénesis somática, el más extensamente utilizado es el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS) en el caso de roble (Mallón *et al.*, 2011) y papaya (Ascencio-Cabajal *et al.*, 2008), de igual manera el Schenk y Hildebrandt (SH) para el caso de alfalfa (McDonald y Jackman, 1989) y agave (Rodríguez-Sahagún *et al.*, 2011). También se destaca el medio de cultivo B5 de Gamborg en el caso de *Commiphora wightii* (Kumar *et al.*, 2006), cada uno con algunas variantes como; la fuente de carbono (sacarosa, sorbitol, manitol, fructosa y maltosa), el componente vitamínico y los reguladores de crecimiento.

2.7.7 Antecedentes en especies forestales

La obtención de embriogénesis somática es reportada en especies forestales

como: *Quercus robur* (Mallon *et al.*, 2011), *Hevea brasiliensis* (Etienne *et al.*, 1997), *Eucalyptus citriodora* (Muralidharan *et al.*, 1989), *Camptotheca acuminata* (Sankar-Thomas *et al.*, 2008), *Aesculus carnea* (Zdravkovic-Korac *et al.*, 2008), *Camellia reticulata* (Plata *et al.*, 1991) y varias especies de *Pinus* (Liao y Amerson, 1995; Li y Huang, 1997; Salaj *et al.*, 2005) entre otras.

2.7.8 Embriogénesis somática en *Bursera*

Solo fue posible obtener información de la especie *Cammiphora wightii* perteneciente a la familia Burseraceae, de ella se extrae la oleo-resina llamada guggulsterona, usada en el tratamiento de hiperlipidemia e hipercolesterolemia, de ésta especie se logró evidenciar la obtención de embriones somáticos mediante fotomicrografías y la producción de la oleo-resina (Kumar *et al.*, 2004 y 2006).

2.8 Efecto del tipo de luz en la morfogénesis

El crecimiento y desarrollo vegetal son actividades dependientes de la luz, esta relación se conoce como fotomorfogénesis la cual está mediada por fotorreceptores (fitocromo y criptocromo) que pueden o no interaccionar y producir cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos (Spalding y Folta, 2005), gracias a la información que adquieren de la calidad, cantidad, dirección y fotoperiodicidad de la luz que controla su crecimiento y diferenciación (Bergareche y Moysset, 1993). Es así que la luz es el elemento ambiental más importante para el desarrollo de las plantas, y provee energía suficiente para realizar la fotosíntesis. Cabe mencionar que los fotorreceptores son moléculas proteicas con capacidad de absorber la luz gracias a que poseen uno o más cromóforos. Por ejemplo los fitocromos son fotorreceptores de luz roja (600 a 700 nm) y luz roja lejana (700 a 800 nm), los

criptocromos son fotorreceptores de luz azul (400 a 500 nm) y ultravioleta A (320 a 400 nm) que tienen dos cromóforos y las fototropinas de luz azul y UV-A.

2.9 Producción de metabolitos secundarios *in vitro*

La biosíntesis, transformación y degradación de compuestos endógenos mediante proteínas de especialización, es lo que comúnmente se conoce como metabolitos secundarios. La biosíntesis de estos compuestos suele estar restringida a estados específicos de desarrollo del organismo, de células especializadas y a periodos de estrés causados por deficiencia de nutrientes o al ataque por microorganismos. Estos pueden estar implicados en relaciones ecológicas como, los pigmentos en flores o compuestos que inhiben el desarrollo de otros organismos, protección a la planta de infecciones o de los depredadores; otros compuestos tienen importancia fisiológica en la formación del polímero estructural lignina o sirven como señales que integran la diferenciación celular y el metabolismo de la planta (hormonas) (Piñol y Palazón, 1993).

2.10 Usos de linalol y acetato de linalol

Las esencias son y serán ampliamente utilizadas por la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética, ello implica altos costos de producción de esencias generadas a través de material vegetal, además éstas industrias demandan cada vez más esencia y esto no exime a la esencia de linalol, así mismo las esencias tienen un corto tiempo de vida, ello eleva su costo, por eso, últimamente se ha planteado usar microorganismos como una alternativa para producir esencias, específicamente *Escherichia coli* para producir linalol

(Thanasomboon *et al.*, 2012). Se calcula que el uso mundial de esencia de linalol supera las 1000 toneladas métricas por año (Lapczynski *et al.*, 2008).

El factor determinante de la demanda de fragancias son: cantidades de usos cosméticos, frecuencia de uso, y la concentración de fragancia en el producto, entre los que se destacan lociones de cuerpo, cremas faciales, cremas con fragancia, antitranspirantes, shampoo, productos de baño, gel para baño, jabón de tocador, spray para cabello, productos de limpieza para el hogar y detergentes (Letizia *et al.*, 2003).

Cabe señalar que todas las especies de *Bursera* producen aceites esenciales del grupo de los terpenos y ellos les infieren distintos aromas, sin embargo estudios con cromatografía de gases muestran que la presencia y cantidad de terpenos varía más entre individuos que entre especies del mismo género (Rzedowski *et al.*, 2004), por lo cual en este estudio solo se trabajó con un genotipo de *B. linanoe*. para comprobar la síntesis de metabolitos según el tipo de luz al que fue sometido.

2.11 Sistemas de cultivo en medio líquido

En los últimos años se han planteado nuevas estrategias para el desarrollo de métodos innovadores de propagación que permitan superar las limitaciones propias a la micropropagación. Entre ellas se encuentran los biorreactores de inmersión temporal, sistemas de inmersión temporal, sistemas con inclinación, sistemas con inmersión completa o parcial y en matraz Erlenmeyer con agitación y reposo. Estos sistemas líquidos representan producción a bajo costo.

Los antecedentes indican que la producción de plantas en sistemas de inmersión temporal comparada con la micropropagación convencional, reduce los

costos de producción entre un 40% y 60% y mejora sustancialmente la calidad de las plantas producidas (Chu, 1995), en abeto se reportó un 81 % de reducción de costos gracias a la mejora del protocolo del cultivo y mano de obra, siendo ésta última la más significativa (Ibaraki y Kurata, 2001), además permiten su automatización y una fácil renovación de medio de cultivo, lo que facilita un continuo crecimiento del material vegetal (Etienne y Berthouly, 2002).

2.12 Sistemas de inmersión temporal

Los sistemas de inmersión temporal se describen como, el conjunto de objetos y equipo que juntos conforman un sistema que ayuda al desarrollo y crecimiento de individuos en menor tiempo, costo y espacio, éstos utilizan frecuencias de inmersión en recipientes individuales los cuales están divididos en dos partes; la inferior que contiene el medio de cultivo líquido y el otro el material vegetal, éste es conectado a una entrada de aire proveniente de un compresor que permite que la solución escale hacia el material vegetal. La frecuencia y la duración de las inmersiones se dan por un temporizador y el flujo de gases o aire que ingresa es esterilizado por medio de filtros hidrofóbicos. Todo esto le infiere ventajas, pues es un sistema semiautomático (Etienne y Berthouly, 2002).

2.12.1 Limitantes de los sistemas de cultivo de inmersión temporal

Quizás el efecto más indeseable al utilizar estos sistemas sea la sobrehidratación, caracterizada por desórdenes morfológicos y fisiológicos, tales como: tejido de apariencia vidriosa o acuosa y hojas anormales (Ziv, 1995), este efecto se puede evitar reduciendo los periodos y tiempos de inmersión (Aitken-Christie y Jones, 1987).

2.13 Sistemas Estacionarios

Se trata de sistemas que albergan al material vegetal y al mismo tiempo contienen medio de cultivo líquido sin movimiento alguno, al cabo de cierto tiempo el medio se reemplaza por uno nuevo en condiciones totalmente estériles (Etienne y Berthouly, 2002).

2.14 Sistemas en Agitación

Estos son sistemas que alojan al material vegetal y al medio de cultivo líquido, mismos que están en constante agitación, lo que permite al material vegetal tener un poco de intercambio gaseoso, situación que no ocurre en el sistema estacionario (Etienne y Berthouly, 2002).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del Experimento

Esta investigación se realizó durante dos años en el Laboratorio de Biotecnología del Programa de Fruticultura, ubicado en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, en México y en el laboratorio de Fitoquímica CI-105 de la Universidad de las Américas Puebla, en Puebla México.

3.2 Material Vegetal

Se emplearon masas proembriogénicas y embriones somáticos de linaloe, los cuales fueron formados a partir de material vegetativo, usando como explantes, secciones de hojas jóvenes y cotiledones de plántulas germinadas *in vitro*, de árboles nativos de *B. linanoe* seleccionados (Arellano-Ostoa *et al.*, 2009a). Se utilizó la línea embriogénica LEL 61-4 que fue obtenida en el Laboratorio de Biotecnología de frutales, del Programa de Fruticultura del Colegio de Postgraduados campus Montecillo.

3.3 Medio de cultivo base

El medio de cultivo líquido consistió en medio MS, suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.027 μM de ácido naftalén acético (ANA), 0.022 μM de benciladenina (BA), para el medio de cultivo tradicional se utilizó el mismo medio de cultivo, solidificado con 6 g L⁻¹ de agar, el pH fue ajustado a 5.7., los recipientes tipo RITA® y los medios de cultivo se esterilizaron con una autoclave durante 20 minutos a 121 °C (20 psi).

3.4 Medios de cultivo para germinación de embriones somáticos

El primer medio de cultivo (MG1) consistió en medio MS, suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.027 μM de ácido naftalén acético (ANA), 0.022 μM de benciladenina (BA), 500 mg de caseína hidrolizada y 500 mg de polivinilpirrolidona, solidificado con 6 g L⁻¹ de agar, el pH fue ajustado a 5.7

El segundo medio de cultivo (MG2) consistió en medio MS, suplementado con 40 g L⁻¹ de maltosa, 0.1 mg L⁻¹ ácido giberélico (AG₃), 0.1 mg L⁻¹ brasinosteroides (BR) y solidificado con 6 g L⁻¹ de agar, pH ajustado a 5.7.

3.5 Condiciones de incubación

Todos los trabajos de embriogénesis, en sistema de inmersión temporal y embriogénesis somática tradicional se llevaron a cabo en un cuarto de incubación, con diferentes tipos de luz provistas por lámparas tipo LED azul (54 μmol m⁻² s⁻¹) blanca (32 μmol m⁻² s⁻¹) y rojo (65 μmol m⁻² s⁻¹) con temperatura diurna y nocturna de 25 ± 2 °C, y un fotoperiodo de 16 h (Figura 1).

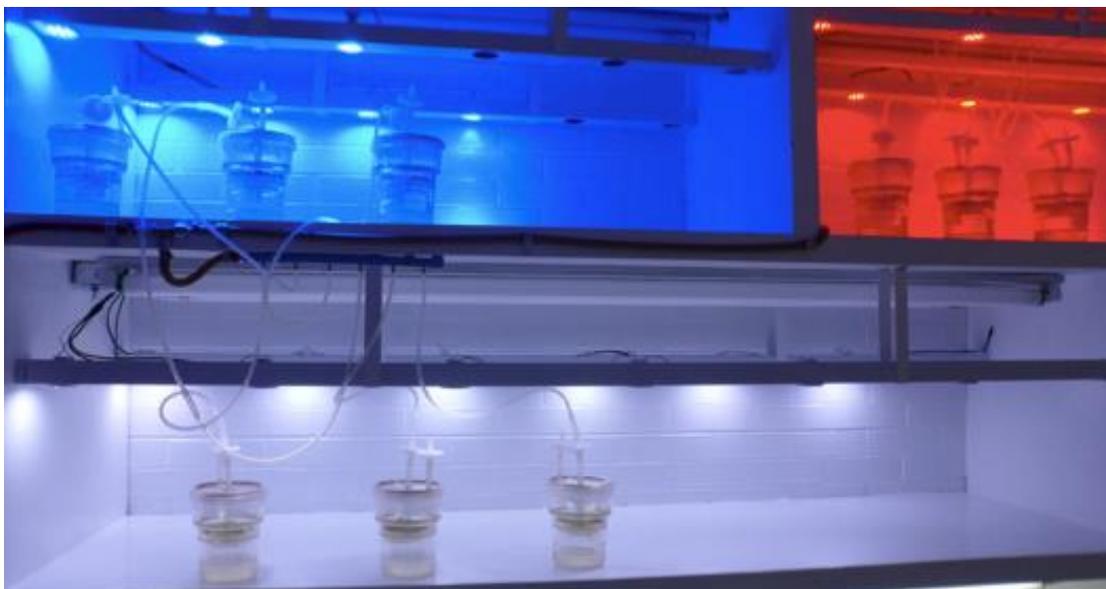


Figura 1: Cuarto de incubación con recipientes de inmersión temporal y tipos de luz.

3.6 Experimento 1. Producción de embriones somáticos y cálculo del índice de crecimiento en sistema de inmersión temporal y sistema tradicional

Se usó un sistema de inmersión temporal tipo RITA[®], el cual fue diseñado por el Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD) en Montpellier, Francia. El material vegetal introducido al sistema de inmersión temporal fue una cantidad de 500 mg sin importar las etapas de desarrollo de los embriones somáticos del clon LEL 61-4 y 150 ml. de medio de cultivo líquido base, lo mismo se utilizó para el sistema tradicional. La distribución de aire desde el compresor a los recipientes se hizo a través de mangueras de silicona y tubos de policloruro de vinilo o PVC, la frecuencia y el tiempo de inmersión se controló a través de un temporizador digital programable (marca Lloyds Electronics modelo LR-910), a 1 min. cada 4 h. durante 30 días.

Finalizado el periodo de cultivo las variables de estudio fueron el total de embriones así como las etapas de desarrollo, estas se observaron bajo el microscopio óptico en la campana de flujo laminar y también se registró el peso final del material vegetal, con la ayuda de una caja de petri estéril tarada y sellada con parafilm, el registro del peso fresco se realizó en una balanza analítica.

Se utilizó un diseño experimental factorial con arreglo en bloques completamente al azar con 3 repeticiones por tratamiento considerando un RITA[®] 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 la prueba de separación de medias de Tukey, con un 95 % de confianza. El experimento se repitió tres veces en el tiempo

El índice de crecimiento del material vegetal se calculó con la siguiente formula:

$$= \frac{\text{Peso de la biomasa final} - \text{Peso de la biomasa inicial}}{\text{Peso de la biomasa inicial}}$$

3.7 Experimento 2. Germinación de embriones somáticos en el sistema de inmersión temporal y tipo de luz roja

Se utilizó un recipiente tipo RITA® con 150 ml. de medio de cultivo MG1 sin agar, que contenía 0.5 g. del clon LEL 61-4, en este medio permanecieron 3 semanas con calidad de luz roja, el tiempo y la frecuencia de inmersión fue de 1 min. cada 4 h.

Concluido el periodo de cultivo se evaluaron las siguientes variables: número de embriones cotiledonares, se midió la longitud de cada uno de ellos con una hoja milimétrica y se registró su condición (deformes o anómalos, presencia de cotiledones y de raíz) bajo un microscopio óptico en la campana de flujo laminar.

3.8 Experimento 3. Germinación de embriones somáticos en medio semisólido

Se utilizaron recipientes tipo magenta con 40 ml. de medio de cultivo MG1 que contenían 5 grupos del clon LEL 61-4, en éste medio permanecieron 3 semanas bajo tres calidades de luz (azul, blanca y roja), al cabo del tiempo el material vegetal se trasladó a medio de cultivo MG2, en el cual permaneció 2 semanas y se hizo el cambio de luz de azul a roja, de blanca a roja y de roja a azul.

Finalizado el tiempo de cultivo se procedió a registrar la siguiente variable: porcentaje de embriones cotiledonares. Los datos se transformaron para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$. Para determinar el efecto de los tratamientos, en caso de existir, se aplicó la prueba de separación de medias de Duncan, con un 95 % de confianza.

3.9 Microtécnica para cortes anatómicos en embriones somáticos y masas proembriogénicas

3.9.1 Selección de muestras

En la selección de material vegetal, destacaron embriones en etapa cotiledonar y que presentaban embriogénesis secundaria en la zona del hipocótilo así como en el cuello de la raíz, de igual manera se eligieron masas proembriogénicas. Adicionalmente se seleccionó una planta somática y yemas axilares de plantas adultas con el fin de contrastar la actividad del meristemo con los embriones que no presentan desarrollo apical.

3.9.2 Fijación

Se utilizaron embriones somáticos cotiledonares y masas proembriogénicas de 1 mm. a 10 mm. de longitud, de la línea embriogénica LEL 61-4, los cuales se mantuvieron en el sistema de inmersión temporal tipo RITA® durante 30 días con los distintos tipos de luz.

Los explantes se fijaron con un buffer de fosfatos (formalina 5 %, pH 4.5, 5 mmol), en donde se mantuvieron 8 h. máximo para tejidos menores a 5 mm. y hasta 24 h. máximo para tejidos mayores a 5 mm. posteriormente se transfirieron a una solución de Glicerol 45 %, Alcohol 48 % y agua destilada 7 % (GAA) en donde se mantuvieron para su proceso posterior, las yemas axilares y la planta sufrieron el mismo proceso.

3.9.3 Empaquetado de material vegetal

Todas las muestras se empaquetaron en malla fina sintética que contenía una etiqueta de referencia, hecha en papel encerado misma que poseía un número de referencia hecho con lápiz para su identificación.

3.9.4 Deshidratación

Se inició por introducir las muestras a concentraciones progresivas de Etanol, 50, 75 y 96 %, éstas permanecieron 8 h. mínimo en cada una de las soluciones, posteriormente se hicieron dos cambios con alcohol absoluto (Berlyn y Miksche, 1977).

3.9.5 Infiltración

Esta consistió en utilizar xileno y de alcohol absoluto (1:1), después xileno al 100 %, inmediatamente después, se introdujeron las muestras a una estufa de calentamiento en parafina uno y dos a 62 °C en donde permanecieron 12 h en cada una (Berlyn y Miksche, 1977).

3.11.6 Inclusión

En esta etapa se comenzó por aplicar vacío sobre el material y se formaron bloques con parafina orientando al tejido para realizar los cortes.

3.9.7 Formación del Bloque y Corte

Se formaron bloques con la parafina y se orientó al tejido sobre un platina de calentamiento posteriormente cuando la parafina solidificada se adhirieron al bloque

de madera previamente calentados, después se hicieron cortes al bloque de parafina para formar una pirámide sin dañar al tejido.

Los cortes se hicieron a 10 μm . de grosor con un micrótopo rotatorio (American Optical, Modelo 820). Se conservó el orden de los cortes manejándolos con pinceles en hojas de papel a temperatura ambiente, estos se extendieron sobre el portaobjetos y pegamento, para ello se utilizó adhesivo de cromo (1 % gelatina, 0.2 % fenol y 0.1 % de alumbre de cromo), una vez colocado el corte se utilizó una platina de calentamiento a 60 °C y se dejó escurrir el exceso de pegamento, por último se dejó secar 24 h. en la estufa de calentamiento.

3.9.8 Desparafinado

A los portaobjetos con los cortes adheridos se les eliminó el exceso de parafina en vasos copplin, se hicieron tres cambios en xileno al 100 % durante dos minutos.

3.9.9 Secuencia de Hidratación

Se inició con una solución xileno y alcohol absoluto (1:1), después, alcohol absoluto 100 % posteriormente etanol al 96, 75 y 50 %, con duración de dos minutos en cada solución.

Se usó la tinción con safranina saturada durante 24 h. Los cortes se enjuagaron con dos lavados rápidos con agua durante tres segundos en cada uno para retirar el exceso de safranina, después se deshidrato el material con etanol 50, 75 y 96 % permaneciendo 2 s. en cada solución, luego se aplicó tinción con verde

fijo (disuelto en etanol y ácido acético), se agregaron dos gotas en cada tejido con una duración de 30 s. o 1 min. posteriormente se retiró el exceso de colorante y se realizaron dos cambios con alcohol isopropílico con una duración de 3 s. en cada uno, después los cortes pasaron a una solución de alcohol absoluto y xileno (1:1) enseguida se cambió a xileno uno 100 % y después xileno dos 100 %, posteriormente se realizó el montaje del cubre objetos con resina sintética y se colocaron en una estufa de calentamiento a 60 °C durante 12 h. para después observarlos en un microscopio óptico (Zeiss modelo Axiostar Plus). Las imágenes fueron captadas con una cámara marca Sony modelo Mpegmovieex.

Finalmente se procedió a observar las preparaciones en un microscopio óptico, con el fin de observar las estructuras de la embriogénesis secundaria e indirecta además de observar células en división en el meristemo de apical tanto de un embrión somático y de una planta.

3.10 Extracción por reflujo de linalol y acetato de linalol a partir de embriones somáticos producidos en sistema de inmersión temporal y sistema tradicional

Se recolectaron 100 g. de material vegetal procedente del sistema de inmersión temporal por cada tipo de luz, de igual manera se recolectó material del sistema tradicional se adicionó 700 mL de hexano. Después la muestra se molió en una licuadora, con el fin de tener mayor área de contacto y lograr extraer la mayor cantidad de extracto.

La mezcla se colocó en un matraz bola de 1 L y se le agregó 700 mL de hexano destilado, después se sometió a extracción a reflujo durante 4 h (Figura 2),

después se filtró y se evaporó a presión reducida en rotovapor (Heidolph, Laborota 4000) hasta obtener un aceite amarillo.

Al material vegetal se le realizaron dos extracciones más con el mismo procedimiento.



Figura 2. Material vegetal macerado y sometido a extracción a reflujo con hexano.

3.10.1 Cuantificación de linalol y acetato de linalol por medio de Cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC)

Las curvas de calibración se hicieron con muestras puras de linalol mismo que fue adquirido de la compañía Fluka y el acetato de linalol se preparó en el laboratorio por acetilación de acuerdo a la técnica descrita por Sánchez-Arreola *et al.* (1995). La acetilación se obtuvo a partir de una solución de 1 g de linalol en 10 ml

de piridina y se trató con 10 ml de anhídrido acético. La mezcla se dejó reaccionar a reflujo durante 4 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre hielo y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con H₂O, HCl al 10%, H₂O, solución saturada de NaHCO₃ y H₂O, para después secarse con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó a sequedad en rotavapor a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna empacada con gel de sílice y como fase móvil se usó hexano y mezclas de hexano-CHCl₃. Las fracciones colectadas con hexano-CHCl₃ (1:1) proporcionaron un aceite incoloro que correspondió al acetato de linalol.

Cada uno de los compuestos estándares se disolvieron en una solución MeOH-H₂O (7:3), se filtraron y se inyectaron alícuotas al cromatógrafo de líquidos. Para obtener la curva de calibración, se graficaron los datos obtenidos del área bajo la curva del pico de los cromatogramas contra la concentración de las muestras (Arellano-Ostoa *et al.*, 2009b y 2010).

Los análisis por HPLC se llevaron a cabo en un cromatógrafo de líquidos Perkin Elmer-250, se tomaron 100 mg. de extracto y se diluyeron en 10 ml de metanol, esta solución se filtró con filtros de nylon de 0.45 µm para eliminar partículas insolubles, después se inyectaron 10.0 µL de solución al cromatógrafo, equipado con una columna Xterra C-18 y un detector de índice de refracción. Como fase móvil se usó una mezcla MeOH : agua 70:30 y se dejó correr por 30 min. esto se repitió dos veces más para obtener un promedio, y el cromatograma resultante indica la concentración con el área bajo la curva del pico, y la identidad del compuesto con el tiempo de retención. La concentración se determinó con la curva de calibración extrapolando el área bajo la curva y los porcentajes se obtuvieron de la concentración y del extracto con las siguientes formulas:

Formula 1:

$$= \frac{100 \times \text{Concentración de a cuerdo al área debajo de la curva del metabolito}}{100 \text{ mg de extracto}}$$

Formula 2:

$$= \frac{100 \times \text{resultado de la Formula 1}}{1^{\text{er}} \text{ extracto}}$$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Producción de embriones somáticos en el sistema de inmersión temporal y sistema tradicional

Para iniciar con los resultados de multiplicación de embriogénesis somática en el sistema de inmersión temporal y sistema tradicional, es preciso señalar que las tasas de multiplicación que se han mantenido en el laboratorio con linaloe cuando se conservan en medio semisólido, presenta fluctuaciones en el desarrollo de acuerdo con el genotipo, condiciones ambientales, tipo de medio de cultivo, hormonas, fuentes de carbono etc. En este contexto los resultados muestran diferencias altamente significativas en la tasa de multiplicación de embriones somáticos de linaloe, tanto en sistema de inmersión temporal como en el sistema tradicional ($P < 0.0001$). El Cuadro 1 se puede observar los valores obtenidos después de 30 días de cultivo y es evidente que el sistema de inmersión temporal superó al sistema tradicional. En ambos sistemas se observa desarrollo de embriones somáticos globulares, torpedo y cotiledonares, en conjunto se obtiene 1432.8 embriones somáticos en el sistema de inmersión temporal (Figura 3) y 244 embriones somáticos en el sistema tradicional (Figura 4). Estos datos manifiestan que las condiciones de cultivo líquido favorecen la multiplicación y desarrollo de los embriones somáticos de linaloe.

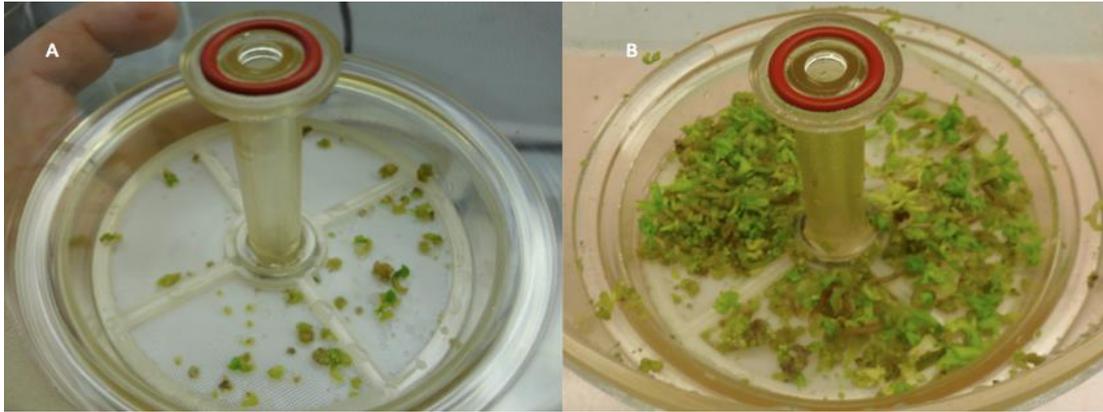


Figura 3. Sistema de inmersión temporal (RITA®). A: sistema de inmersión temporal (día 0) y B: sistema de inmersión temporal (día 30)

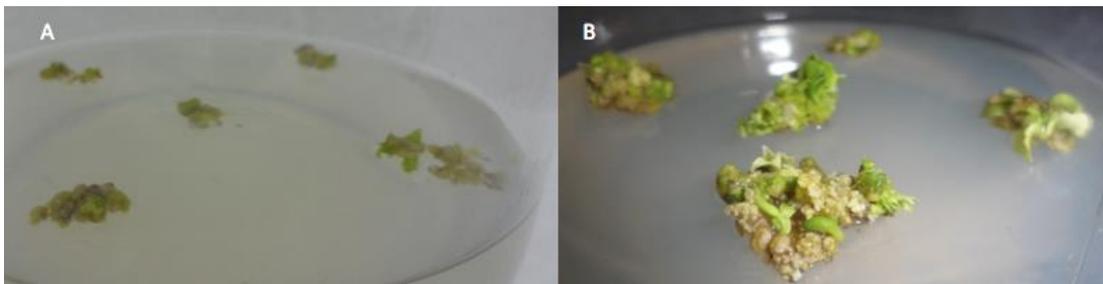


Figura 4. Sistema tradicional con agar. A: sistema tradicional con agar (día 0) y B: sistema tradicional con agar (día 30)

Cuadro 1. Número de embriones somáticos en cada una de las etapas de desarrollo, en sistema de inmersión temporal y sistema tradicional.

Sistema de cultivo	Globo		Torpedo		Cotiledonar		Total	
SIT	1302.8 ±	115.6 a	81 ±	10.4 a	48 ±	6.5 a	1432.8 ±	116.4 a
ST	215.7 ±	17.5 b	14.9 ±	2 b	13.4 ±	1.3 b	244 ±	18.3 b
f-valor	infin		351.08		47.61		infin	
pr-f	<0.0001		<0.0001		<0.0001		<0.0001	

Los valores son la media de tres experimentos repetidos en el tiempo, cada uno con tres RITA[®] y un inoculo embriogénico por RITA[®]. Valores con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). SIT=Sistema de inmersión temporal y ST=Sistema tradicional.

En el sistema de inmersión temporal se observó mayor multiplicación, ya que durante el periodo de cultivo se dio una constante separación de las o la masa proembriogénica (Carneros, 2009), derivado de la agitación en el recipiente de inmersión temporal, aunado a esto influyó la constante aireación que sufría el material vegetal dando como resultado, remoción de la atmosfera al interior del recipiente, llevándose sustancias volátiles como el etileno producido por el material vegetal y parte de la alta humedad relativa, pero esta aireación también apporto CO₂ en mayor o menor medida permitiendo mayor crecimiento o proliferación del material vegetal de linaloe (Zobayed, 2006), Aragón *et al.* (2010) mencionan que los biorreactores de inmersión temporal enriquecidos con CO₂ producen mayor número de plantas competentes, mejor calidad, mejora el metabolismo y la tasa de supervivencia en la etapa *ex vitro*, en contraparte en el sistema tradicional no se dio ninguno de estos efectos, pues es un recipiente hermético que carece de intercambio gaseoso y el medio de cultivo permanece estático, solo se da la difusión de nutrientes hacia los embriones en una área de contacto específica. En este sentido Escalona *et al.* (2003) mencionan que en biorreactores de inmersión temporal con alto flujo de fotones fotosintéticos (225 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) muestran altas concentraciones de CO₂, a consecuencia del metabolismo de la planta, específicamente por la respiración.

Esto hace evidente que las condiciones ambientales y físicas de los recipientes utilizados deriven en cantidad de embriones y masa proembriogénica, calidad y morfología de los embriones somáticos de linaloe, principalmente de los cotiledonares.

Estos datos se acercan con la cantidad de embriones somáticos producidos por Mallón *et al.* (2011), ellos obtuvieron en promedio 1555.6 embriones somáticos de *Quercus robur* en inmersión temporal y con medio semisólido 816.3 embriones somáticos, en *Coffea arabica* (Albarrán *et al.*, 2005) lograron 3081 embriones somáticos por RITA®, asimismo en *Phalaenopsis* existe efecto positivo del sistema de inmersión temporal, 8.2 protocómos adventicios por mes (Tirado *et al.*, 2005), esto reafirma los resultados favorables que se obtienen en el presente estudio con el sistema de inmersión temporal, e indica que este sistema es más eficiente que el sistema tradicional con agar.

En lo que respecta a la tasa de multiplicación de embriones somáticos en las calidades de luz se obtuvieron diferencias altamente significativas en embriones globulares, torpedo y en el total ($P < 0.0001$), en el estadio cotiledonar no existió diferencia significativa. El Cuadro 2 muestra únicamente la multiplicación de embriones somáticos con los tipos de luz, se observó multiplicación total de 922.9 embriones somáticos en luz azul, seguido de 857 embriones somáticos en luz roja y por último 735.2 embriones somáticos en luz blanca, estos datos expresan que la luz interviene en la morfogénesis de los embriones somáticos, y es imprescindible para el desarrollo y crecimiento de los mismos gracias a que actúa como fuente de energía mediante la fotosíntesis (Figura 5), pero también aporta información a la planta de condiciones naturales por medio de la cantidad de luz, la composición espectral, la dirección y el fotoperiodo, estos son aspectos del medio que cambian según el entorno natural como; época del año o plantas vecinas.

Los resultados también demuestran que la calidad de luz azul y roja pueden ser usados para inducir desarrollo de los embriones somáticos gracias a la activación de fotorreceptores como el fitocromo, criptocromo y fototropinas que activan respuestas fototrópicas, movimiento de células oclusivas de los estomas, germinación y el movimiento de los cloroplastos con respecto de la dirección de la luz, aumento en la expresión de genes, proteínas y enzimas.



Figura 5. Embrión cotiledonar, torpedo y globular obtenidos en el sistema de inmersión temporal.

Cuadro 2. Número de embriones somáticos en cada una de las etapas de desarrollo, en los tres tipos de luz.

Tipo de Luz	Globo	Torpedo	Cotiledonar	Total
A	836.3 ± 185.9 a	55.6 ± 14.6 a	31.0 ± 7.7 a	922.9 ± 2000.7 a
B	655.0 ± 126.9 c	49.4 ± 11.3 ab	29.5 ± 7.4 a	735.2 ± 138.0 c
R	786.4 ± 178.3 b	38.9 ± 10.0 b	31.6 ± 6.4 a	857.0 ± 183.9 b
f-valor	infin	7.62	0.07	infin
pr-f	<0.0001	<0.001	0.936	<0.0001

Los valores son la media de tres experimentos repetidos en el tiempo, cada uno con tres RITA® y un inoculo embriogénico por RITA®. Valores con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). A=luz azul, B=luz blanca, R=luz roja.

Los efectos de crecimiento pueden deberse por un lado a la acción de fotorreceptores o proteínas pigmento como el fitocromo que absorbe mayormente luz roja (660 nm a 730 nm) aunque también absorbe luz azul y al criptocromo que actúa con luz azul, (Taiz y Zeiger, 2006) es posible que actúen de forma conjunta o independiente, ya que en un ambiente normal las plantas crecen con luz blanca o solar, misma que tiene todo el espectro de luz visible y por consiguiente ambos están activos, sin embargo al amanecer, cuando esta nublado o cuando se encuentran plantas vecinas hacen que se incremente la luz del rojo lejano lo que favorece reacciones benéficas para algunos estados de desarrollo en las plantas (Casal, 2008), por lo tanto en éste estudio se puede inferir que actuaron de forma independiente ya que los cultivos se mantuvieron en todo momento bajo el mismo tipo de luz.

El fitocromo tiene la propiedad única de la fotoreversibilidad de los efectos morfogenéticos de la luz del rojo (650 – 680 nm) y la luz del rojo lejano (710- 740 nm), esto fue descubierto en la germinación de semillas,

crecimiento de tallos, hojas e inducción de la floración, un ejemplo fue la germinación de semillas de lechuga con luz del rojo e inhibida por la luz del rojo lejano (Taiz y Zeiger, 2006), ello hace suponer que el espectro de luz que incidió sobre los embriones somáticos de linaloe fue luz del rojo lejano ya que no se observó germinación, pero según Casal, (2008) en *Arabidopsis thaliana* la forma Prf y principalmente el fitocromo a y b promueven la germinación de semillas pero también mencionan que se necesita la acción de hormonas como el ácido giberélico para promover el crecimiento del embrión.

Por el otro la elongación de hipocótilos de plantas silvestres es inhibida por la luz blanca misma que es una mezcla de longitudes de onda que incluye la luz del rojo, rojo lejano y azul y el fitocromo está implicado en esta respuesta.

Así mismo hay información que indicó que la luz azul tiene una respuesta rápida en la despolarización de la membrana de las células del hipocótilo, esto activa canales iónicos que facilitan la salida de aniones como el cloruro, y trae como consecuencia la inhibición en la tasa de crecimiento (Taiz y Zeiger, 2006). Es posible que esto no afecte la proliferación y desarrollo del material vegetal, pues fue este tipo de luz donde se encontraron los mejores resultados, porque este tipo de luz junto a la luz roja promuevan la síntesis de clorofila, organización del aparato fotosintético y se sintetizan pigmentos como los antocianos, además una gran cantidad de genes incrementan su expresión, también aumentan los niveles de mRNA de la enzima rubisco, los de las proteínas que unen moléculas de clorofila a y b

a las membranas tilacoides de los cloroplastos, los de la enzima nitrato reductasa (Casal, 2008)

De acuerdo con Rodríguez-Sahagún *et al.* (2011) obtienen resultados similares a los nuestros en la formación de embriones somáticos de *Agave tequilana* Weber var. Azul en medio semisólido y luz azul. Merkle *et al.* (2005) indican buenos resultados en la germinación y conversión de embriones somáticos de tres especies de *Pinus* con luz roja. En ese sentido los fotorreceptores del rojo y azul modulan distintos aspectos de crecimiento y desarrollo gracias a reacciones fotoquímicas, por la excitación del cromóforo que altera a la apoproteína y por consiguiente su capacidad de acción fisiológica.

De acuerdo con los resultados mencionados con anterioridad, es innegable la diferencia que existe entre el total de embriones somáticos de linaloe producidos en ambos sistemas y tipos de luz después de 30 días de cultivo, se observaron tasas de multiplicación distintas. En este sentido al momento de combinar los sistemas y luces, se lograron obtener 1596.5 embriones somáticos de linaloe con luz azul, seguido de 1446.44 con luz roja, en seguida 1255.33 con luz blanca, estos en el sistema de inmersión temporal, inferiormente 267.66 con luz roja, 249.33 con luz azul y 215 embriones somáticos con luz blanca en combinación con el sistema tradicional ($P < 0.0001$) (Figura 6 y Cuadro 3). Estas combinaciones aportan otras características morfológicas y fisiológicas a los embriones somáticos cotiledonares producidos en inmersión temporal, ellos tenían una consistencia rígida y mayor tamaño del embrión y de los cotiledones, ello gracias a las condiciones ambientales dentro del recipiente, permitiendo

respiración de los embriones, salida de compuestos fenólicos, etileno y humedad, en cambio los producidos en medio semisólido eran pequeños y poco turgentes por permanecer en un ambiente hermético.

Cabe señalar que el constante aumento de biomasa supone una baja rápida en la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo líquido, ya que durante el periodo de incubación el material vegetal tuvo un mayor desarrollo durante las primeras 3 semanas, mientras en la última se observaron pocos cambios, situación que no sucedió en el medio de cultivo semisólido ya que el material vegetal no proliferó como en el sistema de inmersión temporal, por las condiciones que existen al interior del recipiente (nulo intercambio gaseoso, difusión de nutrientes en una área de contacto específica, necrosis del material vegetal).

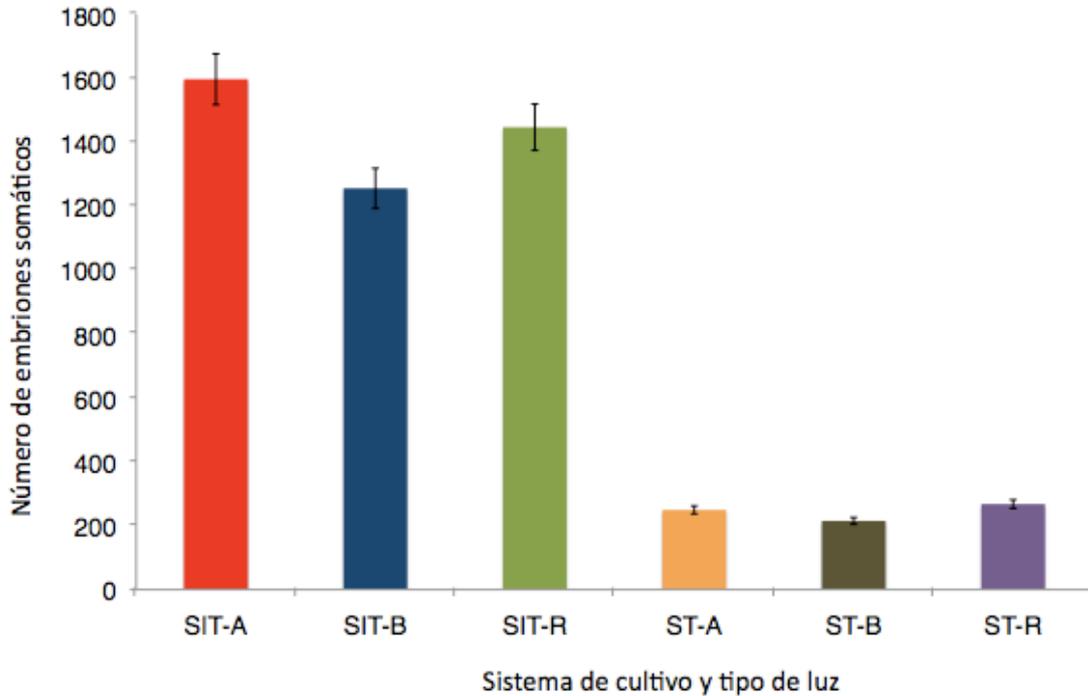


Figura 6. Número total de embriones somáticos sistema de inmersión temporal y el sistema tradicional con los distintos tipos de luz. SIT-A: sistema de inmersión temporal y luz azul, SIT-B: sistema de inmersión temporal y luz blanca, SIT-R: sistema de inmersión temporal y luz roja, ST-A: sistema tradicional y luz azul, ST-B: sistema tradicional y luz blanca, ST-R: sistema tradicional y luz roja. Datos de tres subcultivos sucesivos.

Como se puede observar en los resultados la mayoría de los embriones somáticos producidos en ambos sistemas se observaron en estado globular, estos representan en la mayoría de los casos más del 90 % del total de embriones somáticos producidos (Cuadro 3). También es posible ver la considerable diferencia que existe entre sistemas y las respectivas luces ($P < 0.0001$) que en el menor de los casos llegó a duplicar lo que se produjo en el sistema tradicional. Se puede distinguir tendencia descendente entre embriones somáticos producidos, es decir mayor cantidad de globulares, seguido de torpedo y finalmente cotiledonares, esto indica que las etapas de desarrollo continúan en ambos sistemas, sin embargo al ser irradiados con tipos de luz distintos se observó mayor tamaño de embriones

cotiledonares, mayor turgencia y buena coloración verde intenso, esto con luz roja y azul.

El sistema de cultivo líquido induce el desarrollo del material vegetal, por las condiciones que se generan al interior de cada recipiente RITA® como son: remoción de la atmosfera del recipiente y entrada de aire nuevo, cada embrión o masa proembriogénica recibe medio de cultivo líquido y la constante separación de las masas proembriogénicas producto de las inmersiones y burbujeo que esto genera. Aunado a ello la luz es el agente crucial para aumentar el desarrollo del material vegetal, gracias a la activación de fotorreceptores que desencadenan una serie de cambios morfológicos (extensión celular, germinación y fototropismo) y fisiológicos (fosforilación de factores transcripción, modificación de crecimiento con hormonas, desetiolación, movimientos estomáticos y síntesis de pigmentos).

Finalmente, en ninguno de los casos se observó sobrehidratación del material vegetal, específicamente en el caso del sistema de inmersión temporal donde es común topar con este problema fisiológico, caracterizado por células que albergan grandes cantidades de agua y que le dan apariencia vidriosa al tejido vegetal, ello derivado del frecuente contacto con el medio de cultivo líquido, pero por fortuna el tiempo y frecuencia de inmersión fueron los correctos para evitar este problema en linaloe.

Cuadro 3. Número de embriones somáticos en cada una de las etapas de desarrollo, en combinación con diferentes tipos de luz en el sistema de inmersión temporal y sistema tradicional con agar.

Tratamiento	Globo	Torpedo	Cotiledonar
sitb	1130.67 ± 107.27 c	77.33 ± 17.74 b	44.77 ± 13.00 a
sita	1446.89 ± 228.49 a	100.00 ± 20.21 a	49.66 ± 12.54 a
sitr	1330.67 ± 245.19 b	65.88 ± 15.84 b	49.77 ± 9.37 a
stb	179.33 ± 18.22 f	21.44 ± 5.57 c	14.22 ± 2.17 b
sta	225.66 ± 38.43 e	11.22 ± 0.93 c	12.44 ± 2.53 b
str	242.22 ± 30.19 d	11.88 ± 0.51 c	13.55 ± 2.39 b
f-valor	infin	77.35	9.62
pr-f	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Los valores son la media de tres experimentos repetidos en el tiempo, cada uno con tres RITA® y un explante embriogénico por RITA®. Valores con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). sit-a sistema de inmersión temporal y luz azul, sit-b sistema de inmersión temporal y luz blanca, sit-r sistema de inmersión temporal y luz roja, st-a sistema tradicional y luz azul, st-b sistema tradicional y luz blanca, st-r sistema tradicional y luz roja.

Los resultados obtenidos muestran que existió una posible sincronía en la formación y desarrollo de embriones somáticos de linaloe, mencionada por Mallón *et al.* (2011) y Etienne *et al.* (1997) con el sistema de inmersión temporal en *Quercus robur* y *Hevea brasiliensis* y luz blanca. Sin embargo existió información que menciona que la sincronización no es posible en la totalidad los embriones somáticos y es frecuente observar embriones en distintas etapas de desarrollo en cualquier fase (Aguilar *et al.*, 2008), como es

el caso de esta investigación. En roble observaron disminución en la cantidad de embriones en estado globular, corazón, torpedo y aumento en la cantidad de cotiledonares (Mallón *et al.*, 2011), lo que en este trabajo se da a la inversa, posiblemente corresponda a la falta de algún compuesto que se deba de añadir al medio de cultivo, cambio del mismo, e inclusive se deba a la disminución de la capacidad embriogénica a consecuencia de los constantes subcultivos como sucede con *Pinus pinea* L. (Carneros, 2009), o mejor ajuste de los tiempos de inmersión, aunque puede aumentar un posible efecto de sobrehidratación, como sucedió con *Coffea arabica*, donde se obtuvieron 90 % de embriones sobrehidratados con 15 min de inmersión, también es viable encontrar mejor frecuencia de inmersión, para lograr mayor cantidad de embriones cotiledonares (Albarrán, 2005), Cabasson, (1997) con Citrus observó este efecto en el sistemas tradicional, pero en nuestro estudio los embriones somáticos producidos en ambos sistemas no presentaron problemas de sobrehidratación.

En lo que se refiere a los porcentajes de embriones somáticos cotiledonares Mallón *et al.* (2011), lograron obtener porcentajes mayores de embriones somáticos cotiledonares de *Quercus robur* (93 %) que nuestro estudio, en *Quercus suber* (Pérez *et al.*, 2013) obtuvieron 11.33 %, y con linaloe se alcanza más del doble de lo ellos consiguieron.

La acumulación de biomasa en linaloe concuerda con lo mencionado por Escalona *et al.* (2003) quienes encontraron una mayor acumulación de biomasa y por consiguiente mayor acumulación de nutrientes, en los biorreactores de inmersión temporal con alto flujo de fotones fotosintéticos

mientras que el material vegetal del sistema tradicional no proliferó de igual forma.

4.2 Índice de crecimiento

En esta investigación se notó el incremento en biomasa en ambos sistemas, como ya se observó en el número de embriones producidos en inmersión temporal presenta alta tasa de proliferación, y ello se reflejó en el registro del peso fresco, una vez más el mejor registro se da con la calidad de luz azul e inmersión temporal 8.8 g, esto representó un incremento de 16.8 veces respecto del peso inicial (índice de crecimiento), en contraparte en el sistema tradicional y luz roja mostraron el mejor resultado (2.4 g), en el Cuadro 4 se pueden observar los demás resultados, y se distingue tendencia favorable en inmersión temporal con diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$).

Cuadro 4. Peso fresco e índice de crecimiento del material vegetal en el sistema de inmersión temporal y el sistema tradicional.

Sistema y luz	Índice de crecimiento	Peso
sit-b	13.2 ± 1.0 c	7.0 ± 0.4 c
sit-a	16.8 ± 1.0 a	8.8 ± 0.4 a
sit-r	15.8 ± 1.2 b	8.2 ± 0.6 b
st-b	4.3 ± 0.3 e	2.1 ± 0.1 e
st-a	4.0 ± 0.2 f	2.0 ± 0.1 f
st-r	4.7 ± 0.6 d	2.4 ± 0.2 d
f-valor	infin	
pr-f	<0.0001	

Los valores son la media de tres experimentos repetidos en el tiempo, cada uno con tres RITA® y un explante embriogénico por RITA®. Valores con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). sit-a sistema de inmersión temporal y luz azul, sit-b sistema de inversión temporal y luz blanca, sit-r sistema de inmersión temporal y luz roja, st-a sistema tradicional y luz azul, st-b sistema tradicional y luz blanca, st-r sistema tradicional y luz roja.

Pérez *et al.* (2013) con *Quercus suber* L. al utilizar una frecuencia de inmersión de 1 min. cada 4 h. con 1.5 g. de inóculo por RITA® lograron obtener 5 g. más de peso fresco que lo obtenido por este estudio, y en una prueba con 0.5 g. de inóculo y reduciendo la frecuencia de inmersión a 1 min cada 6 h. consigue resultados que concuerdan con lo obtenido en este estudio con el sistema tradicional.

4.3 Germinación de embriones somáticos en el sistema de inmersión temporal y tipo de luz roja

Es preciso mencionar que en el primer experimento se lograron 49.7 embriones somáticos cotiledonares de linaloe con el sistema de inmersión temporal y tipo de luz roja, al modificar el medio de cultivo con la adición de polivinilpirrolidona y caseína hidrolizada aumentó el número de embriones cotiledonares (61).

En esta prueba se logró observar proliferación y desarrollo de embriones cotiledonares, que en algunos casos alcanzaron longitud de 0.3 a 2 cm. pero al obtener la media del tamaño de los embriones se consiguió 0.71 cm. de longitud. En lo que respecta a embriones somáticos producidos, el 5 % tenían sólo cotiledones, 15 % presentaban sólo raíz y el 80 % mostraban cotiledones y raíz (Figura 7), por otro lado se observó 33 % de embriones deformes o anómalos entre los que se puede describir: fusionados, enroscados, doblados y con cotiledones muy grandes (Figura 8 y 9), y el 67 % poseían condición favorable para continuar el desarrollo, es decir germinados (Figura 10). En la Figura 11 se muestran porcentajes de embriones cotiledonares por categorías longitudinales de 0.3 (16 %), 0.5 (39 %), 0.8 (13 %), 1 (21%), 1.5 (8 %) y 2 cm (2 %).

Estos porcentajes demuestran que el cambio de medio de cultivo y la luz roja produjeron cambios significativos en el desarrollo de los embriones cotiledonares, como son mayor tamaño, buena apariencia y buena coloración, por consiguiente es un proceso de cultivo más eficiente para lograr la conversión de embriones somáticos a plantas.

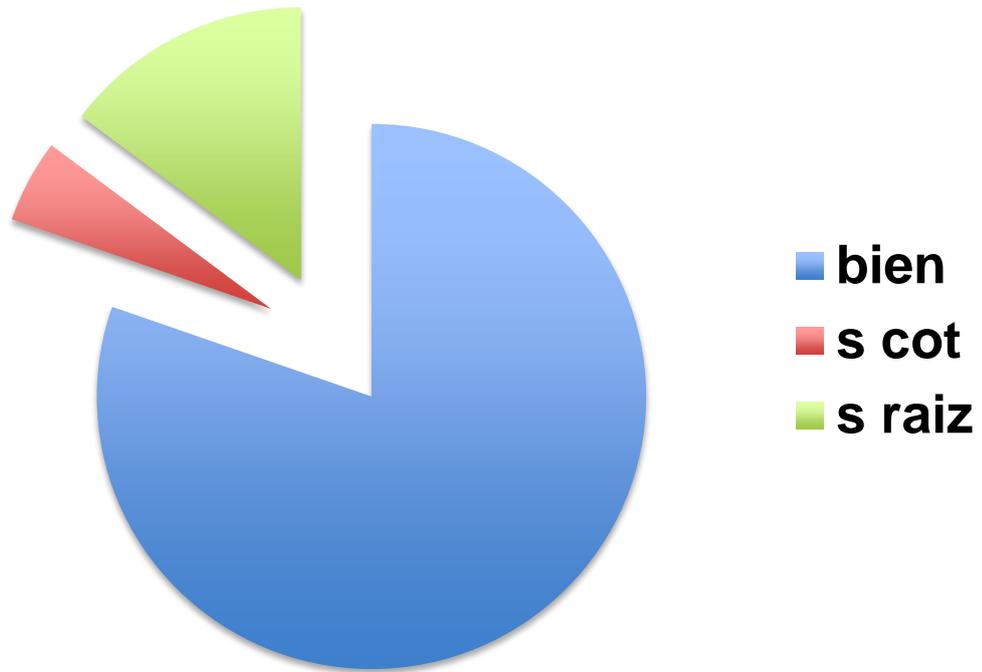


Figura 7. Porcentaje de la formación de cotiledones y raíz de embriones cotiledonares producidos en el sistema de inmersión temporal y luz roja. bien: embriones completos, s cot: embriones sin cotiledones, s raíz: embriones sin raíz

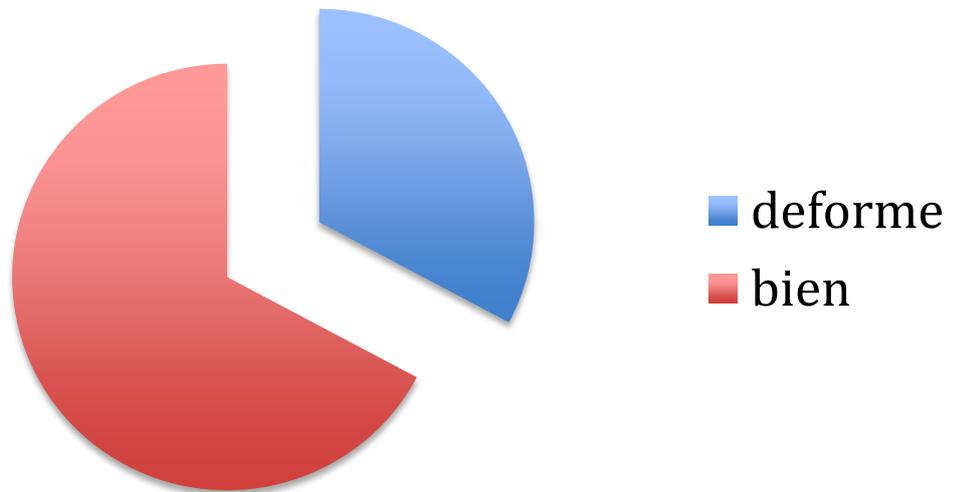


Figura 8. Porcentaje de la condición de embriones somáticos cotiledonares producidos en el sistema de inmersión temporal y luz roja.

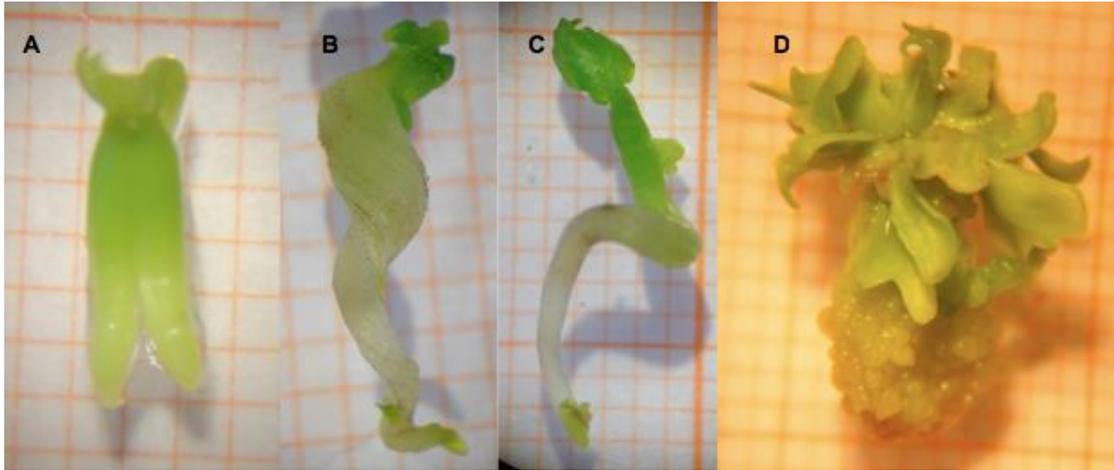


Figura 9. Embriones somáticos deformes o anómalos. A: Embriones somáticos cotiledonares fisiónados en la región del hipocótilo, B: embrión cotiledonar enroscado, C: Embrión cotiledonar doblado y D: embrión cotiledonar con cotiledones grandes.



Figura 10. Embrión cotiledonar bien formado.

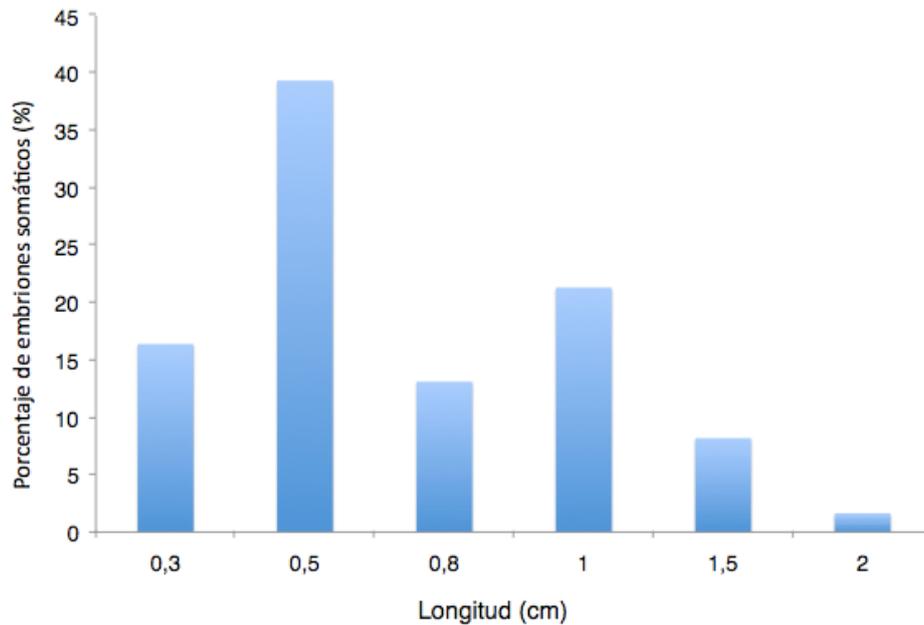


Figura 11. Porcentaje de embriones cotiledonares por categorías longitudinales producidos en el sistema de inmersión temporal y luz roja.

Rodríguez-Sahagún *et al.* (2011) mencionaron que la germinación de embriones somáticos de agave depende del espectro de luz que se aplicó al callo embriogénico, en nuestro caso fue luz blanca fluorescente, al utilizar medio de cultivo líquido se produce mejor difusión de los nutrientes al cubrir cada uno de los embriones con medio de cultivo líquido, acción no presente en el sistema tradicional semisólido, de aquí se deduce la importancia de las condiciones bióticas y abióticas emuladas en el cultivo de tejidos, que generan un entorno idóneo para la germinación normal de especies vegetales.

De acuerdo con lo mencionado por Ascencio-Cabral *et al.* (2008) usando embriones somáticos de *C. Papaya* obtuvieron 70 % de embriones somáticos germinados con medio semisólido, suplementado con Phloridzin y lámparas grolux, en el presente estudio se observó un similar porcentaje de

embriones germinados, también indicaron germinación del 22 % con luz roja, Rodríguez-Sahagún *et al.* (2011) mencionaron alrededor de 58 % de embriones de agave germinados con medio semisólido MS con luz blanca y luz de amplio espectro, además muestran 22 % de embriones somáticos germinados con luz roja. Es así que la adición de polivinilpirrolidona y caseína hidrolizada al medio de cultivo favoreció el crecimiento de los embriones en esta etapa desarrollo y posibilita acercar el proceso embriogénico hacia la obtención de plantas, aunque no se logró observar la aparición de hojas verdaderas.

Una posible respuesta a las anomalías de embriones somáticos puede tener respuesta en la agitación y cambio posición dentro del recipiente, por efecto de las inmersiones y por consiguiente un cambio en el transporte polar de auxinas, Bhojwani y Bhatnagar, (1999) mencionaron que el interferir con este transporte deriva en anomalías morfológicas.

Es preciso señalar que los embriones somáticos que sólo presentan raíz posiblemente hayan tenido cotiledones, pero las constantes inmersiones y el roce con el material vegetal hayan hecho que se desprendieran de los mismos, ya que en el medio de cultivo se observaron restos de tejido vegetal (cotiledones).

4.4 Germinación de embriones somáticos en medio semisólido

Los resultados obtenidos del cambio de medio de cultivo y tipos de luz no mostraron diferencias significativas ($P < 0.09$), sin embargo sobresale el

tratamiento con luz roja al inicio y azul al final (Cuadro 5), esta es la combinación que da mejores resultados en el porcentaje de embriones cotiledonares (16.1), es posible que la luz roja inicie un proceso de diferenciación y especialización celular (germinación, crecimiento y síntesis de clorofilas) y al hacer el cambio a luz azul active otras respuestas fisiológicas que derivan en el desarrollo del embrión somático, es así que al usar luz roja al inicio y azul al final produce efecto positivo primero en el crecimiento y después en el desarrollo del embrión.

Cuadro 5. Porcentaje de embriones cotiledonares con cambios de tipos de luz y del medio de cultivo.

Tratamiento	Cotiledonar
a-r	14.21 ± 2.02 a
b-r	8.74 ± 1.31 a
r-a	16.18 ± 2.50 a
F-Valor	3.69
Pr f	0.0904

Los valores son la media de tres experimentos repetidos en el tiempo, cada uno con tres RITA[®] y un explante embriogénico por RITA[®]. Valores con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Duncan, $p \leq 0.05$). a-r: luz azul a roja, b-r: luz blanca a luz roja y r-a: luz roja a azul. 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.

De acuerdo con Ascencio-Cabral *et al.* (2008) obtuvieron aproximadamente 24 % de embriones somáticos germinados de *C. Papaya* y calidades de luz rojo+azul, Rodríguez-Sahagún *et al.* (2011) mencionan alrededor de 43 % embriones somáticos germinados de agave con el cambio de luz roja al inicio y azul al final mantenidos en medio semisólido MS, también señalan 14 % en el cambio de luz blanca y roja, por último 20 % de luz azul a roja, estos resultados son similares a los nuestros en cuanto a la respuesta fotomorfogénica de los embriones somáticos cotiledonares, y muestra la pauta para que sea probado en el sistema de inmersión temporal con resultados seguramente favorables, ya que en la prueba anterior con la adición de caseína hidrolizada y polivinilpirrolidona al medio de cultivo produjo buenos resultados.

4.5 Embriogénesis secundaria

Durante el estudio se pudo observar la formación de embriones somáticos secundarios principalmente en la región del hipocótilo de embriones somáticos bien conformados, este proceso morfogénico ocurrió sin que mediara la formación de callo, después de 30 días de cultivo en el sistema de inmersión temporal. Al momento de ser procesados y cortados para su análisis anatómico, se logró demostrar la ocurrencia de la formación de protuberancias o estructuras globulares a detalle, aunque en estado inicial, específicamente nódulos meristemáticos, originándose de la protodermis y tejido meristemático fundamental del hipocótilo, la Figura 13 muestra la región del hipocótilo y la respectiva formación de nódulos meristemáticos bien delimitados por protodermis. Es de esperarse que la

formación de estas estructuras termine por completar la formación del embrión globular y subsecuentemente las demás etapas de desarrollo de la embriogénesis, tal como se observó durante los subcultivos de mantenimiento, en ellos se vio la formación de estas estructuras hasta completar todas las etapas de desarrollo del embrión (Figura 12).



Figura 12. Embriogénesis somática secundaria. Nótese el par de embriones cotiledonares pequeños unidos al embrión somático cotiledonar

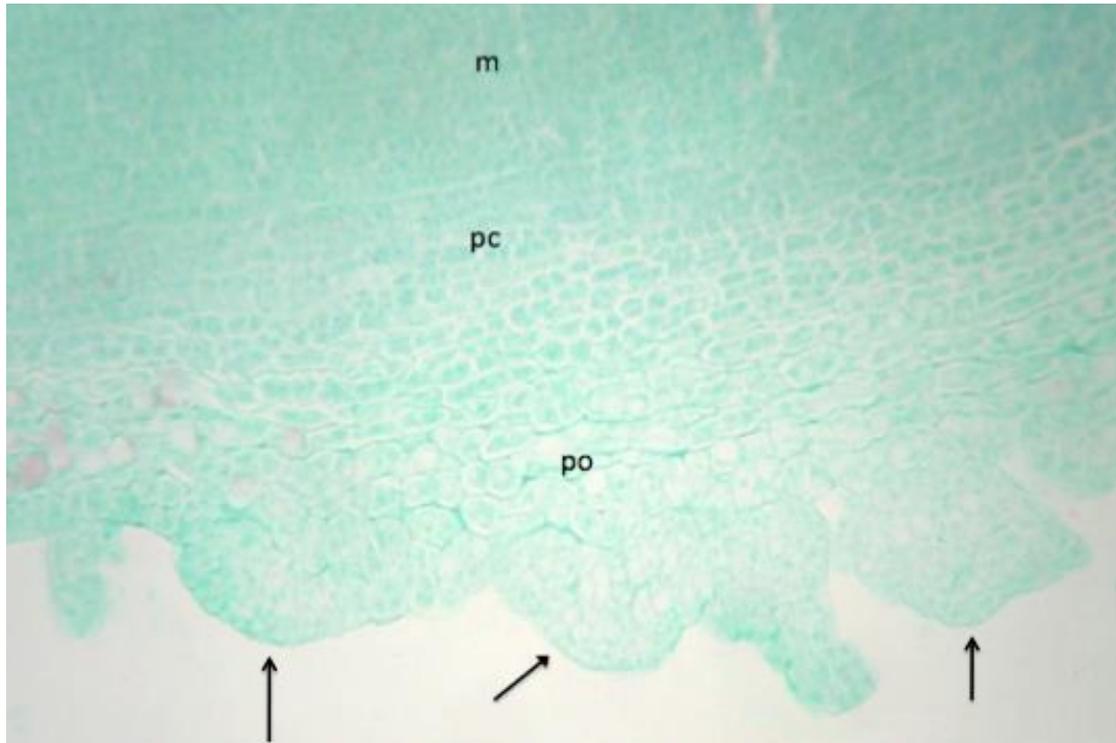


Figura 13. Nódulos meristemáticos (flechas) de embriogénesis secundaria en hipocótilo de un embrión cotiledonar. m) médula, pc) procámbium, po) parénquima cortical. Objetivo 20 x.

Al igual que en esta investigación Paunescu, (2008) indicó la formación de meristemoides que a su vez formaron la estructura globular del embrión y subsecuentemente las demás etapas de desarrollo; además observó altas tasas de proliferación de embriogénesis secundaria a mayor concentración de auxinas y con bajas concentraciones esta se reduce. Estos embriones secundarios se originan de células epidérmicas divididas periclinalmente. En pistache durante la inducción de la embriogénesis somática, los embriones se originan de células individuales o pequeños agregados de células en la zona epidérmica mediante divisiones asimétricas (Onay, 2000). En roble se observó que la embriogénesis se forma de 3 ó 4 células epidérmicas que presentan primero divisiones periclinales, después anticlinales y posteriormente ambas indefinidamente (Zegzouti, 2001), en

Psychotria acuminata Lara *et al.* (2003) mencionaron que la embriogénesis somática tiene origen uni y multicelular y que el proceso morfogénico no es sincronizado. Es probable que en linaloe se presente este patrón de divisiones en la región epidérmica del hipocótilo al igual que el origen celular, ya que en algunas preparaciones se observó tanto un origen uni como multicelular. Así mismo Plata *et al.* (1991), observaron la emergencia de embriones somáticos secundarios en *Camellia reticulata* principalmente en grupos celulares de la región del hipocótilo; esto también se presentó en *Camiphora wightii* (Kumar *et al.*, 2006). En arabidospis (von Recklinghausen *et al.*, 2000) y en roble (Vieitez *et al.*, 2011) se han reportado resultados similares, lo que concuerda con el presente trabajo, sin embargo, los resultados difieren en el desarrollo de los embriones somáticos secundarios, mientras en *C. reticulata* y *C. wightii* hay desarrollo hasta la etapa torpedo, en linaloe sólo se observaron nódulos meristemáticos o etapas tempranas de globulares, pero como ya se mencionó anteriormente se espera que el desarrollo embriogénico continúe.

4.6 Masa proembriogénica

El cultivo en inmersión temporal estimuló la proliferación de una gran cantidad de embriones somáticos, la mayoría de ellos producto de masas proembriogénicas o embriogénesis indirecta con embriones somáticos en distintas etapas de desarrollo. Después de procesar las porciones de masas proembriogénicas se obtuvieron imágenes de los cortes anatómicos, ello reafirmó la ocurrencia de embriones somáticos desde sus inicios, que van desde nódulos meristemáticos, pasando por estados globulares,

acorazonados y torpedo. La Figura 14 muestra las primeras divisiones de células epidérmicas, la Figura 15 muestra a embrión preglobular bien delimitado por protodermis, la Figura 16 y 17 muestran un embrión acorazonado de igual manera bien delimitados por protodermis con divisiones anticlinales, es en esta etapa donde se comienza a distinguir la polarización del embrión, es decir, el eje que va del meristemo apical y al meristemo radicular, la figura 18 y 19 muestran un embrión torpedo con divisiones periclinales y oblicuas, las células más internas dan origen al cuerpo del embrión adventicio (ead) y las células adyacentes al tejido epidérmico (pd). Ambas regiones se dividen intensamente para formar al embrión. El estrato protodérmico se divide sólo anticlinalmente para englobar al resto del embrión.

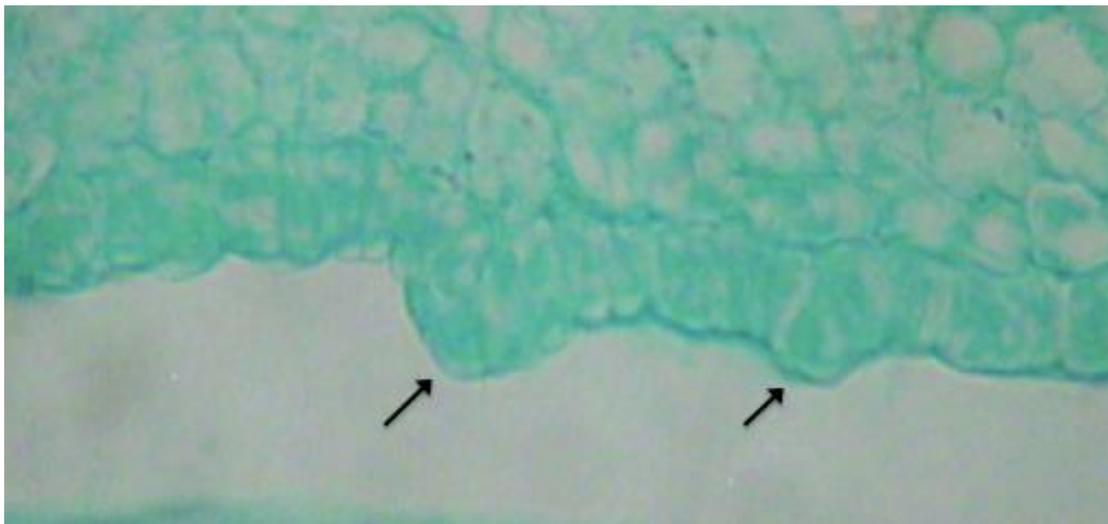


Figura 14. Embriogénesis indirecta, inicio de embriones globulares (flechas).
Objetivo 40 x.

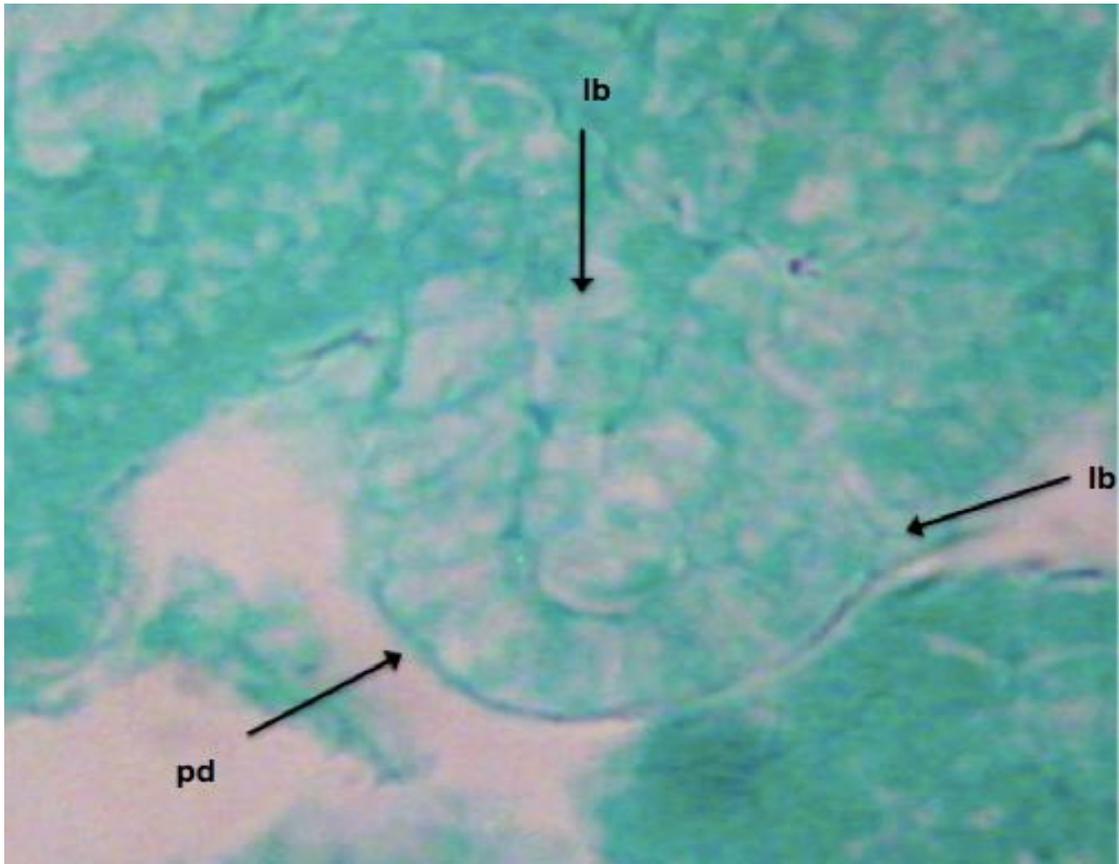


Figura 15. Embrión pre-globular pd: protodermis, lb: límite basal del embrión. Objetivo 40 x.

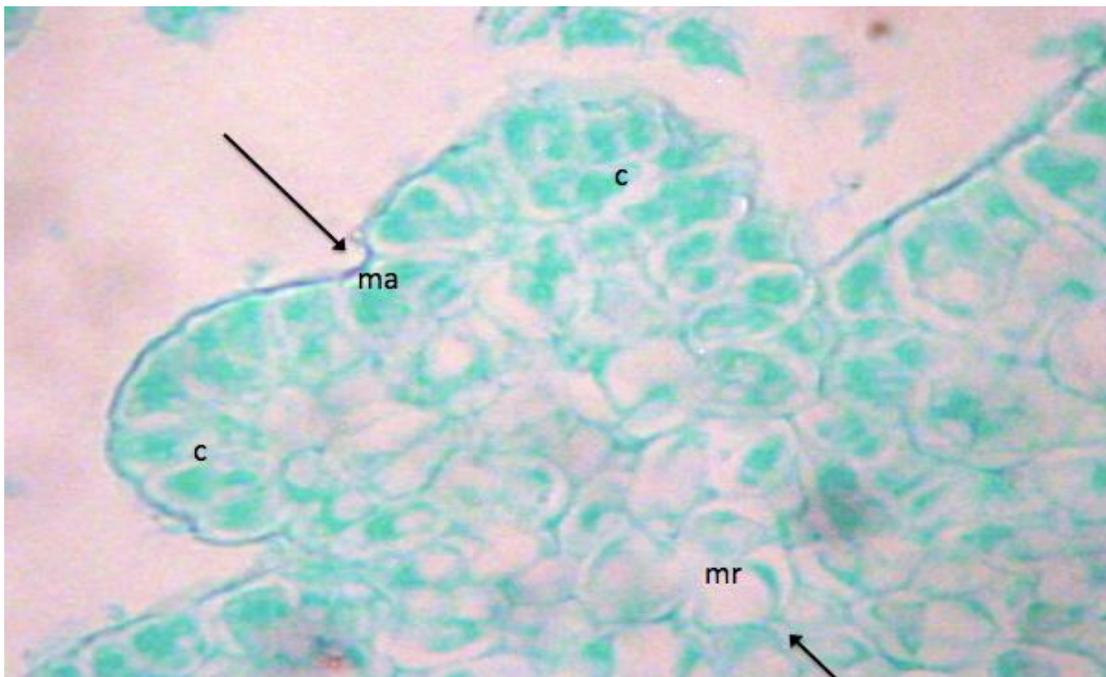


Figura 16. Embrión acorazonado 1, c: cotiledón, ma: meristemo apical y mr: meristemo radicular. Objetivo 40 x.

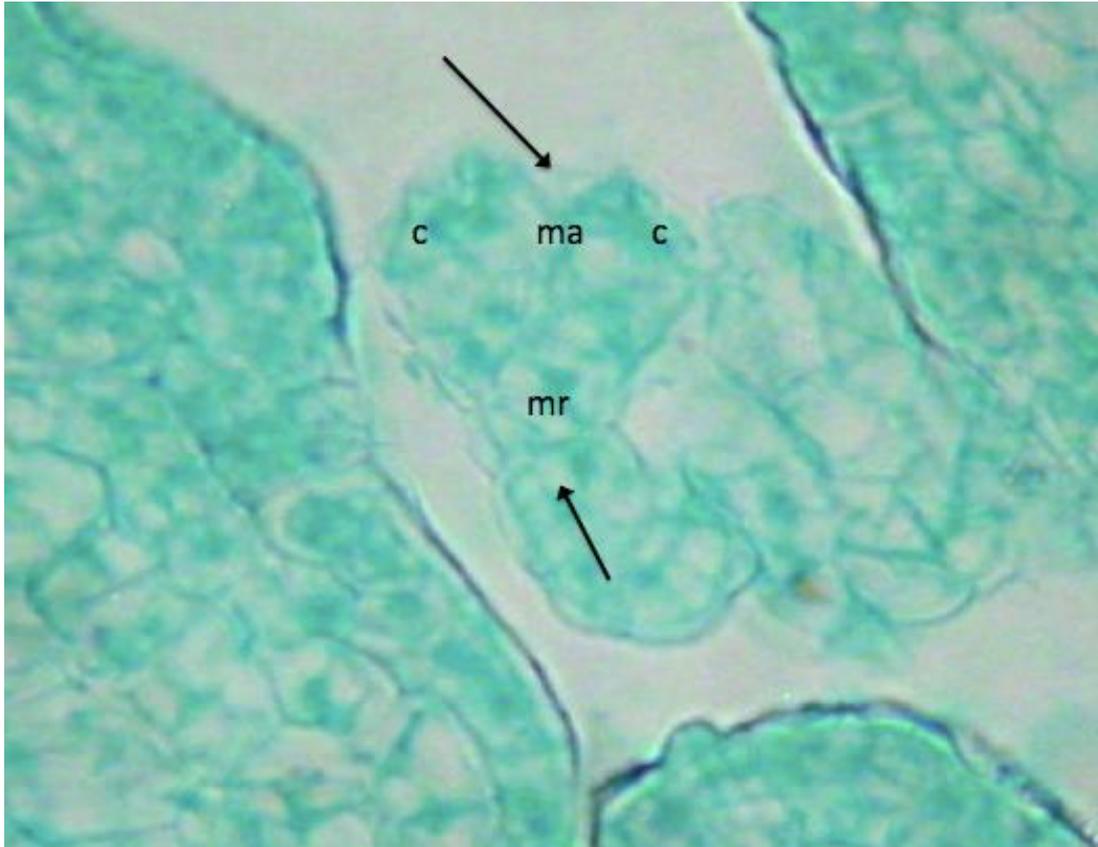


Figura 17. Embrión acorazonado 2, c: cotiledón, ma: meristemo apical y mr: meristemo radicular.. Objetivo 40 x.



Figura 18. Embrion entre globular y torpedo, ead: embrión adventicio, pd: protodermis. Objetivo 40 x.

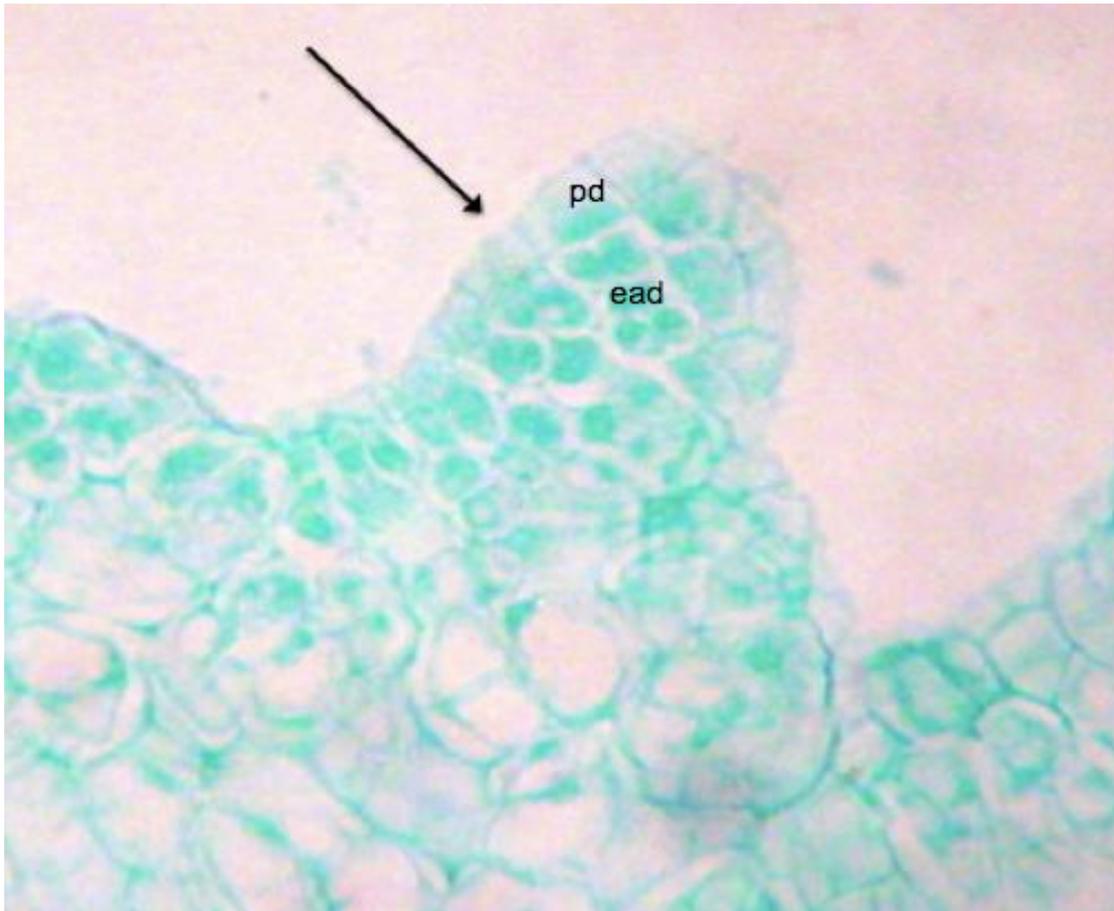


Figura 19. Embrión en estado de torpedo inicial, ead: embrión adventicio, pd: protodermis. Objetivo 40 x.

En *Quercus robur* la embriogénesis somática se forma en la superficie del tejido embriogénico, desarrollándose de manera similar a la observada en linaloe. En *arabidopsis* se encontró la formación de grupos de células meristemáticas en su mayoría dentro del callo (von Recklinghausen *et al.*, 2000), pero en nuestro caso no se da así, sino que el origen embriogénico de linaloe pareciera tener origen en la epidermis al igual que Bezerra *et al.* (2006) y von Recklinghausen *et al.* (2000) a partir de una o unas cuantas células (4 o 6). Es así que la ocurrencia de la embriogénesis somática indirecta queda de manifiesto con las fotomicrografías antes presentadas y se evidencia el proceso de cada una de los estados de desarrollo del embrión somático.

4.7 Meristemo apical

Durante el periodo de cultivo se lograron obtener embriones somáticos en estado cotiledonar bien desarrollado pero en ninguno de ellos se vio la emergencia de primordios foliares normales (Figura 20), las imágenes de los cortes anatómicos indican poca actividad en el meristemo, escasas células se encontraron en división (mitosis), es preciso señalar que la mayoría de la células se encuentran en interfase. También se distinguen, primordios de cotiledones.

En contraparte, se vio que el meristemo apical de una planta adulta de linaloe que se conservó en invernadero (Figura 21), mantenía una intensa actividad mitótica, en ella se observaron muchas células en mitosis, además de un par de primordios foliares y un tricoma de tipo glandular que presenta un pie corto y una cabeza globosa multicelular (Castro y Torrecilla, 2013). Es posible observar el tamaño reducido que presenta el meristemo del embrión somático y un ligero abultamiento en ambos, también se distinguen células de la protodermis más grandes que las del resto del meristemo en la planta, mientras que las del embrión somático parecen ser del mismo tamaño.

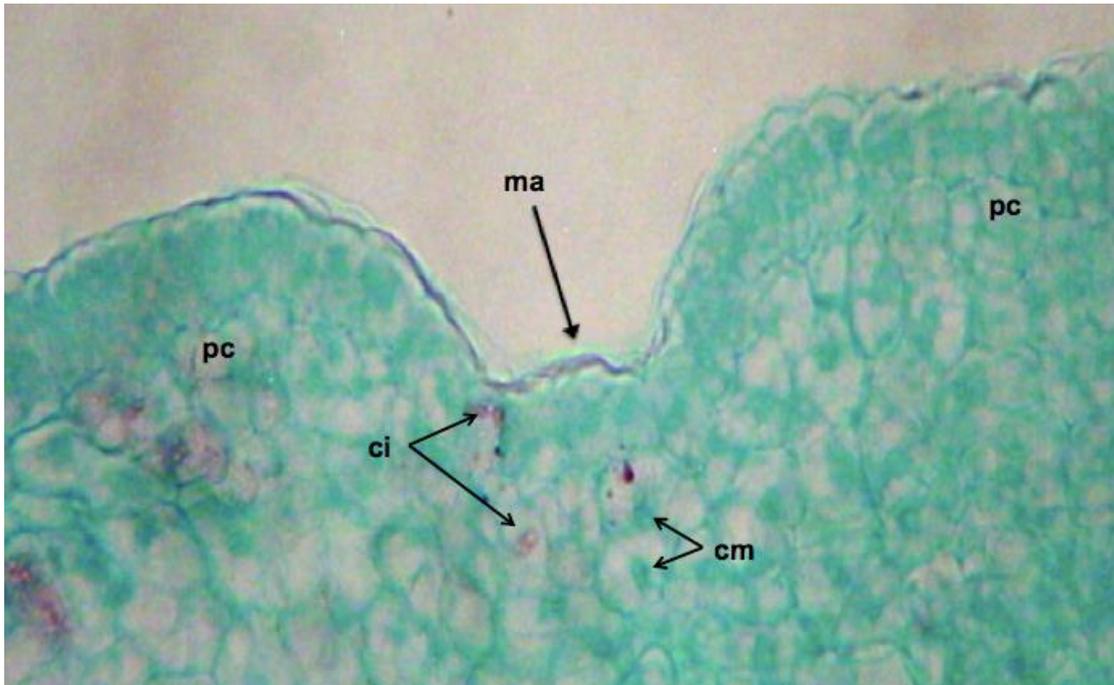


Figura 20. Meristemo apical (ma) de un embrión somático, cm: células en mitosis, ci: células en interfase, pc: primordio cotiledonar. Objetivo 40 x.

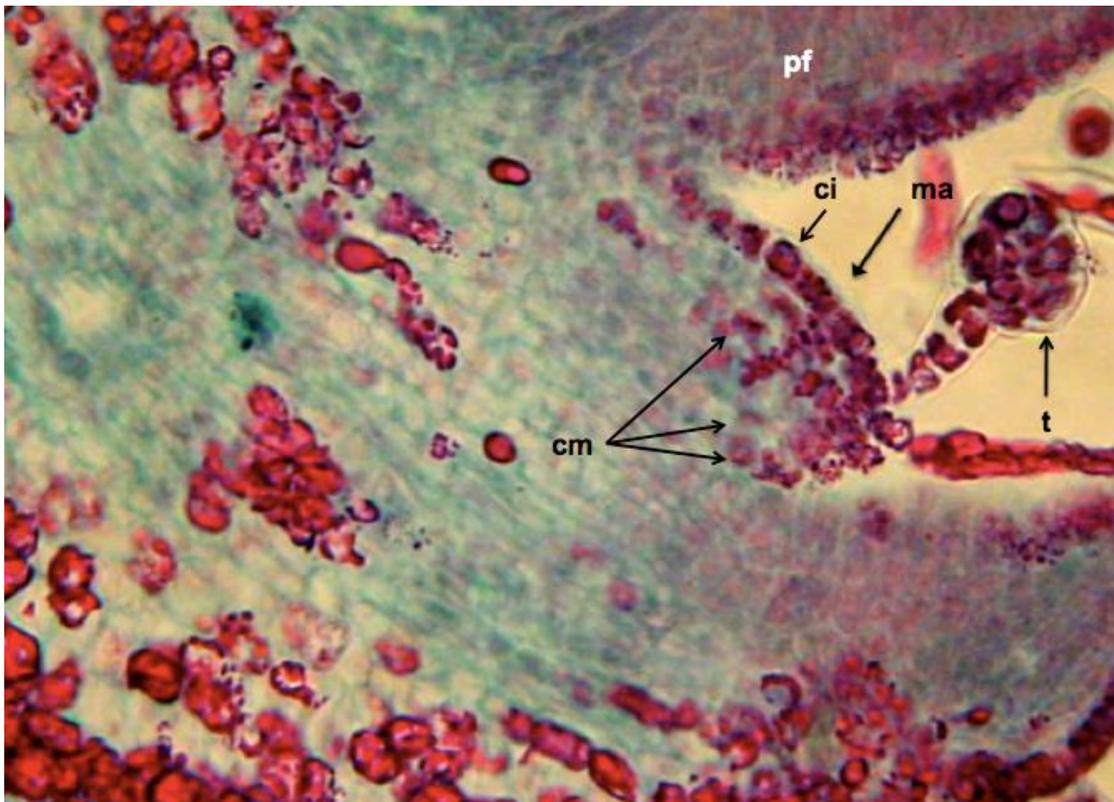


Figura 21. Meristemo apical (ma) de una planta adulta de linaloe, cm: células en mitosis, ci: células en interfase, pf: primordio foliar y t: tricoma glandular. Objetivo 40 x.

Es posible que la poca o nula actividad del meristemo caulinar en el embrión somático se deba a una variación somaclonal, resultado de la intensa división celular que sufre el tejido embriogénico, derivado de los constantes subcultivos, provocando la falta de germinación de los embriones y la ausencia de la aparición de hojas verdaderas o normales de la especie (Wilhelm, 2000). Probablemente el gen STM (del inglés shootmeristemless), se expresa para formar las células que constituyen el meristemo apical y al no estar activado suprime la diferenciación celular y como consecuencia, las células permanecen indiferenciadas (Taiz y Zeiger, 2006). Por otro lado puede suceder que el meristemo caulinar, carezca de reservas de carbohidratos o proteínas tal como sucede con Citrus (Cabasson, 1997), y es probable que este tipo de compuestos sólo sean aportadas por el medio de cultivo. En lo que respecta al tamaño y abultamiento del ápice caulinar se debe a la poca diferenciación de células apicales, en *arabidopsis* Mordhorst *et al.* (2002) indicaron que el meristemo de embriones somáticos mutantes no estaba presente y los que no eran mutantes si lo tenían. Schoof *et al.* (2000) mencionaron que en *arabidopsis* la células epidérmicas y sub-epidérmicas se dividen anticlinalmente y las células internas aleatoriamente para formar el tejido interno tal como sucede en *linaloe*. Sin embargo aún no fue posible dilucidar la razón por la cual el meristemo caulinar de los embriones de *B. linanoe* no se desarrolló, ya que en otros estudios con distintas fuentes de carbono y hormonas no se logra la aparición de hojas normales.

4.8 Extracción y cuantificación por reflujo de linalol y acetato de linalol por medio de cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC)

Los resultados de la extracción de linalol y acetato de linalol presentan variaciones en su concentración en las distintas muestras de material vegetal *in vitro*, en el Cuadro 6 se muestran las cantidades de extracto por sistema de cultivo en combinación con distintos tipos de luz, el mejor peso de extracto lo tuvo la luz roja después la luz blanca, posteriormente sistema tradicional y por último luz azul. Es probable que el tipo de radiación y el sistema de cultivo ejerzan un estímulo para la producción de distintos compuestos metabólicos, ya que como se muestra más adelante el extracto conserva metabolitos secundarios del interés de este estudio, como es linalol y acetato de linalol pero se presentan en distinta concentración.

Cuadro 6. Datos de la extracción de aceite de embriones y masas proembriogénicas de linaloe a reflujo.

Sistema de cultivo y tipo de luz	Peso de extracto (g)
ST y fluorescente	0.43
SIT y blanca	1.07
SIT y azul	0.35
SIT y roja	2.01

ST: sistema tradicional y SIT: sistema de inmersión temporal.

El rendimiento de la extracción de aceite es bueno, porque se demuestra la síntesis de compuestos metabólicos que de primera mano parece ser poca cantidad pero confirman su presencias en las masas proembriogénicas y embriones somáticos de *B. linanoe* (Figura 22, 23, 24 y

25). Sin embargo, debido a las condiciones del método se aíslan otros componentes que afectan el aroma y la consistencia de la esencia, lo anterior se explica debido a que los terpenos linalol y acetato de linalol tienen una presión de vapor alta lo que provoca que se evaporen con el tiempo y la temperatura del secado. Esto hace probable que el rendimiento de los compuestos sea mínima, pero suficiente para confirmar su presencia.

El método tradicional para obtener esencia de madera o de frutos de *B. linanoe* es por arrastre de vapor, método que requiere por lo menos 1.0 kg de muestra ya que los rendimientos son del 0.15 % - 0.20 % para tallo fresco y de 1.2 % - 2.0 % para fruto. (Sánchez-Arreola, 2013). Por lo anterior para hacer una comparación se requeriría contar con la misma cantidad de material embriogénico.

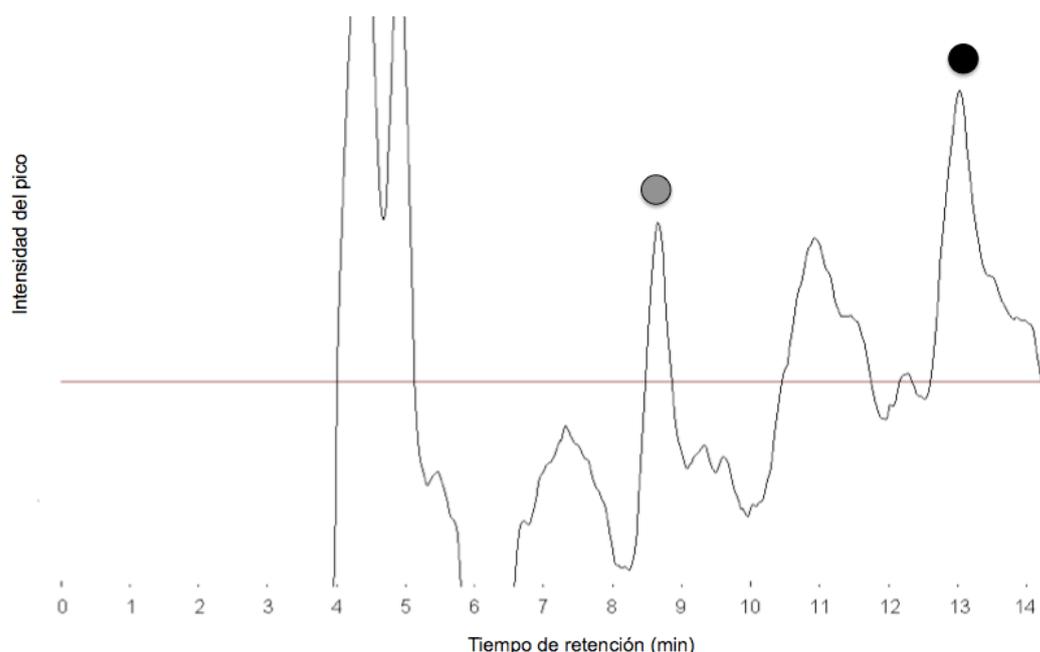


Figura 22. Cromatograma de la esencia de linalol (circulo gris) y acetato de linalol (circulo negro) de masas proembriogénicas y embriones somáticos producidos en el sistema tradicional y luz blanca fluorescente.

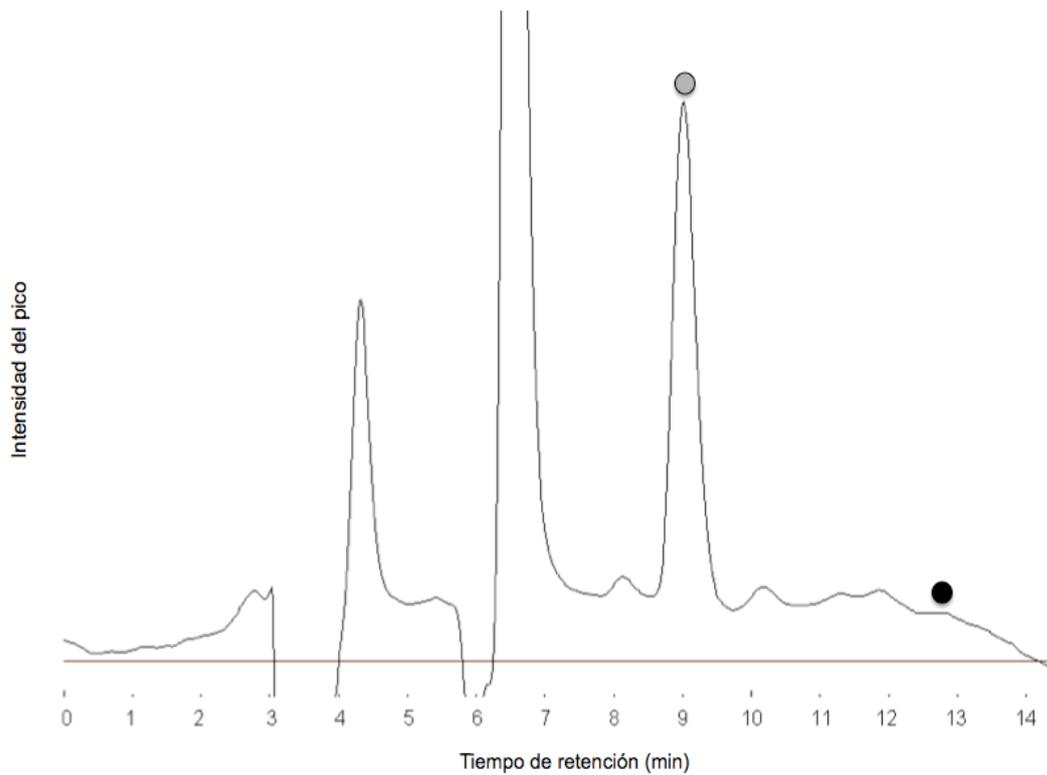


Figura 23. Cromatograma de la esencia de linalol (circulo gris) y acetato de linalol (circulo negro) de masas proembriogénicas y embriones somáticos producidos en el sistema de inmersión temporal y tipo de luz roja.

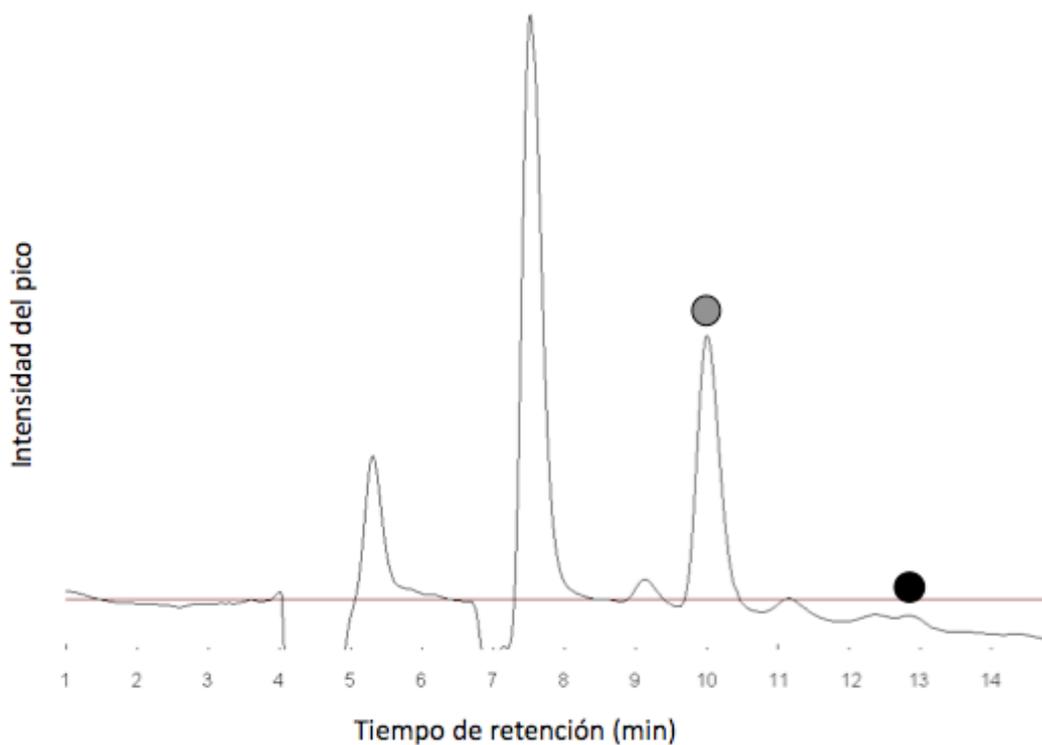


Figura 24. Cromatograma de la esencia de linalol (circulo gris) y acetato de linalol (circulo negro) de masas proembriogénicas y embriones somáticos producidos en el sistema de inmersión temporal y tipo de luz azul.



Figura 25. Cromatograma de la esencia de linalol (circulo gris) y acetato de linalol (circulo negro) de masas proembriogénicas y embriones somáticos producidos en el sistema de inmersión temporal y tipo de luz blanca.

La concentración de los compuestos se determinó con las curvas de calibración con los datos obtenidos del área bajo la curva del pico del cromatograma de HPLC, contra las soluciones tanto de linalol (0.1 a 1.0 mg/mL) (Figura 26), como de acetato de linalol (0.1 a 1.0 mg /mL) (Figura 27).

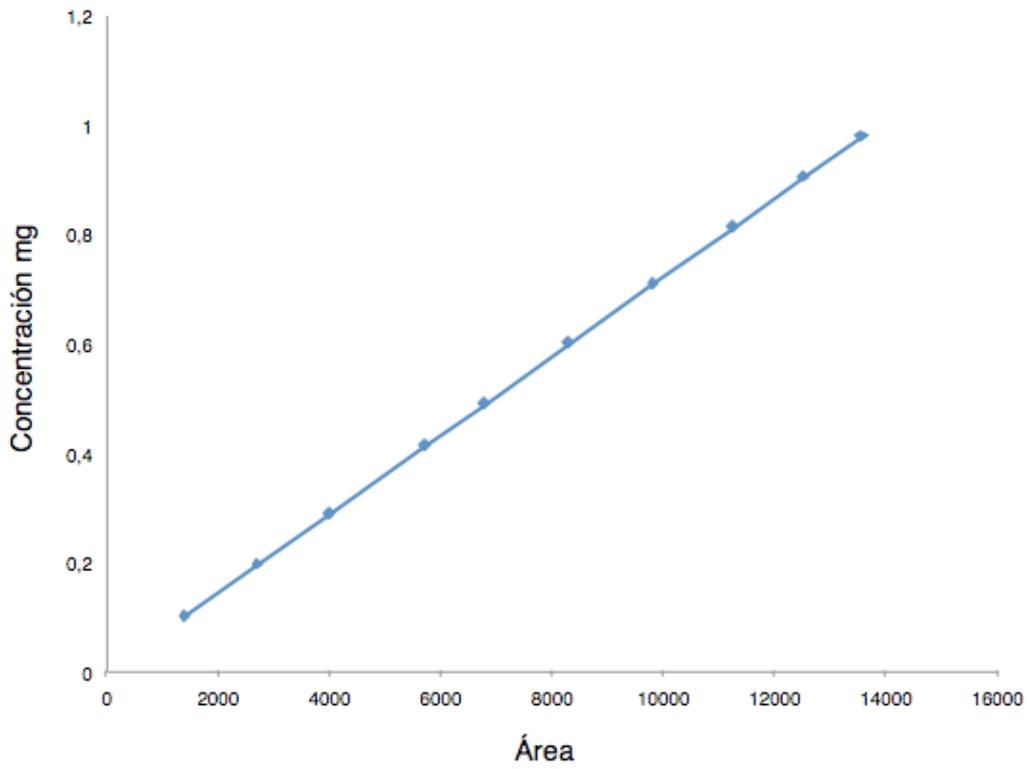


Figura 26. Curva de calibración de linalol.

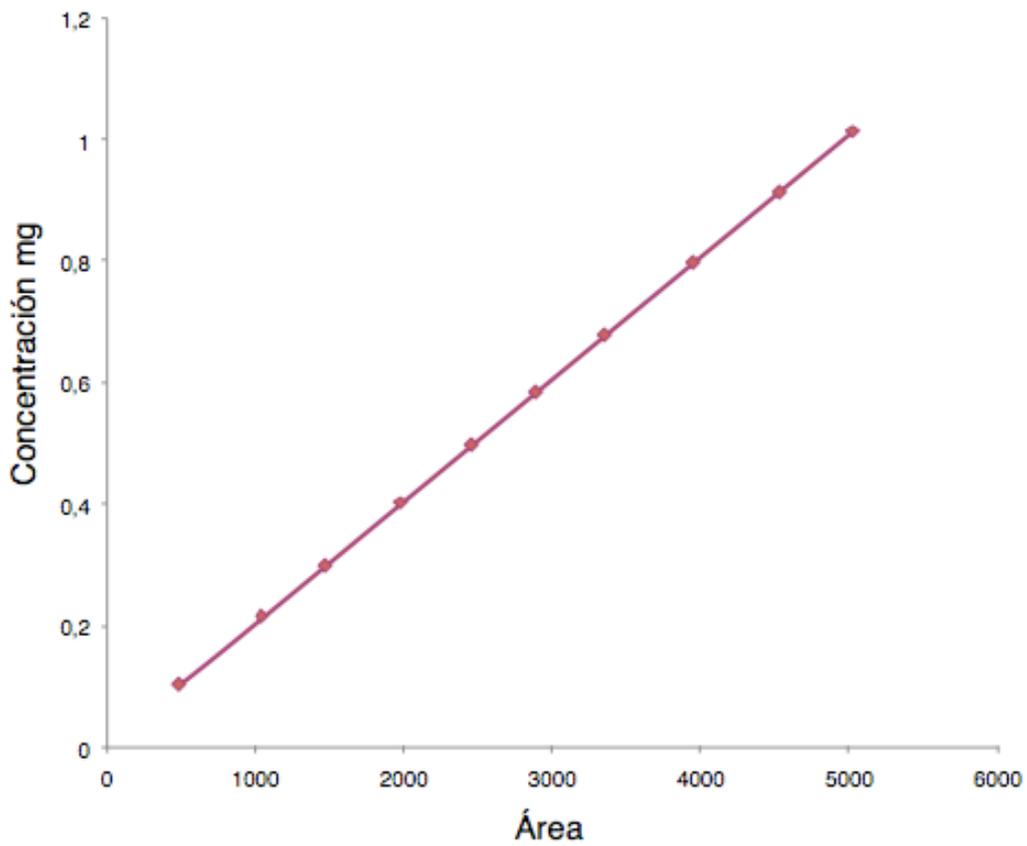


Figura 27. Curva de calibración de acetato de linalol

En el Cuadro 7, se muestran los porcentajes de la concentración de linalol y acetato de linalol, respecto de cada una de las extracciones, en ella se observa que existe mayor producción de acetato de linalol en el sistema tradicional y en menor medida linalol, en contraparte en el sistema de inmersión temporal se distingue más producción de linalol y menor de acetato de linalol, aunque mayor concentración con luz roja, seguido de luz azul, finalmente luz blanca, sin embargo en todas las muestras en proporciones muy bajas respecto al extracto.

Tomando en cuenta que sólo se usó una línea embriogénica se puede deducir claramente que la producción se ve afectada por factores abióticos en un mismo genotipo, ya que con información antes mencionada se indica que la producción de metabolitos es distinta entre individuos de la misma especie. (Rzedowski *et al.*, 2004). En general se puede derivar que el factor determinante para la producción de ambos metabolitos secundarios es el físico o ambiental, por un lado en el sistema tradicional existió un relativo estrés sobre el material vegetal ya que no todo el callo o masa proembriogénica estuvo en contacto con el medio de cultivo, no hubo intercambio gaseoso y se presentó mayor porcentaje de necrosis, por el otro, en el sistema de inmersión temporal existieron condiciones favorables como son: alta humedad relativa, el material vegetal estaba en pleno contacto con el medio de cultivo, poca o nula necrosis y constante remoción de la atmósfera al interior del recipiente, sin embargo hay diferencias de producción en los distintos tipos de luz siendo la luz roja la que indujo mayor

producción de linalol, lo que puede ser resultado de la activación de fotorreceptores y la subsecuente biosíntesis de linalol y acetato de linalol.

Cuadro 7. Porcentaje de la extracción a reflujó de linalol y acetato de linalol, en combinación con distintos tipos de luz.

	Linalol en el extracto (mg)	Linalol en el extracto %	Acetato de linalol en el extracto (mg)	Acetato de linalol en el extracto %
ST + Luz fluorescente	1.48	0.34	2.09	0.48
SIT + Luz blanca	3.37	0.31	2.09	0.19
SIT + Luz azul	1.50	0.43	0.11	0.03
SIT + Luz roja	17.16	0.85	5.41	0.26

ST: sistema tradicional, SIT: sistema de inmersión temporal

Previamente se ha reportado que el tipo y la concentración de fitohormonas pueden jugar un rol importante con respecto de la acumulación de metabolitos secundarios en callos embriogénicos (Georgiev *et al.*, 2011). en este sentido, en *Salvia tomentosa* mill. observaron diferencias en la producción de metabolitos de interés, específicamente con altas concentraciones de citocinina y bajas de auxina, las cuales estimularon la producción de ácido oleanólico. Por otro lado, al momento de usar bajas concentraciones de ambas fitohormonas se incrementó la producción de ácido ursólico (Georgiev *et al.*, 2011), y al igual que en este estudio se usaron bajas concentraciones de auxinas y citocininas, esto hace probable que al usar distintas concentraciones se vea un incremento en la producción de algún metabolito secundario de interés.

En *Commiphora wightii* existió mayor producción de metabolitos secundario en material *in vivo* vs *in vitro*, específicamente en embriones cigóticos y callo embriogénico, entre ellos se registró una diferencia notable 33.1 vs 7.64 µg, el callo no embriogénico presento baja concentración de metabolitos (Kumar *et al.*, 2006). En nuestro trabajo también existe diferencia aunque entre sistemas, esta tendencia favorable se dio a favor del material vegetal que se produjo en el sistema tradicional contra lo producido en el sistema de inmersión temporal, en ese sentido, lo que se vio con *Commiphora wightii* fue que los metabolitos secundarios producidos por embriones cigóticos se dan gracias a factores inherentes al ambiente en el que se desarrollaron estos embriones, esos mismos factores son distintos y manipulables en el cultivo *in vitro*, es así que nuestro estudio presenta similitudes con el estudio de Kumar *et al.* (2006) con respecto del contraste que hay entre dos sistemas de cultivo que comparten ciertas características, pero que no dejan de ser distintos y se observa que al usar uno u otro se afecta la producción tanto de linalol como de acetato de linalol.

Sánchez-Arreola, (2011) encontró mayor producción de acetato de linalol y menor de linalol pero en concentraciones mayores a las obtenidas en el presente estudio (60 % y 39 %), con material nativo de Olinalá Guerrero, de igual forma obtuvo tendencia similar con material de Morelos (64 % y 15 %), específicamente de la esencia de madera y frutos, con la misma técnica que se usó en este estudio, es así que el material vegetal nativo contiene más acetato de linalol y menos de linalol. Pero en estudios realizados con callos embriogénicos y no embriogénicos de linaloe Arellano *et al.* (2009b) mencionan una mayor producción de esencia de linaloe en los callos no

embriogénicos (54.5 mg) con rendimiento del 11 % p/v de acetato de linalol y 2 % p/v de linalol, en comparación con los embriogénicos (32.4 mg) con 3 % p/v de acetato de linalol y 2 % p/v de linalol, estos resultados demuestran que la síntesis de este tipo de metabolitos son menormente sintetizados en tejidos embriogénicos, sin embargo la síntesis de linalol en ambos callos fue similar respecto del p/v, estos resultados difieren ya que en el sistema de inmersión temporal existe mayor síntesis de linalol que de acetato de linalol mientras que en el sistema tradicional con agar existe más acetato de linalol que linalol, lo cual concuerda con lo mencionado por Arellano *et al.* (2009b) y esto hace suponer que las condiciones ambientales propias de los recipientes deriven en la síntesis de estos compuestos.

Como ya se mencionó es probable que esta respuesta se deba al ambiente en donde se desarrolla esta especie, es por ello que en este estudio se obtienen resultados a la inversa, es decir más concentración de linalol y menos de acetato de linalol en el sistema de inmersión temporal, derivado de cambios en el ambiente o bien a una posible hidrólisis del acetato de linalol por la cantidad de agua en el medio de cultivo. Cabe recordar que la biosíntesis de metabolitos secundarios suele ser el resultado de periodos de estrés causados por enfermedades, ataques de microorganismos o al ambiente, es por ello que el material vegetal nativo presenta las concentraciones antes mencionadas, y es factible que el material que proviene de cultivo *in vitro* tradicional presente este patrón de respuesta, por el estrés que recibe el material vegetal al interior del recipiente y el material que proviene de cultivo en inmersión temporal presente poco o nulo estrés al interior del RITA®.

5. CONCLUSIONES

- Es factible la utilización del sistema de inmersión temporal tipo RITA® para la producción de embriones somáticos de linaloe, ya que es un sistema mucho más eficiente que el sistema tradicional con agar. Es indiscutible que este sistema supera al sistema tradicional y es posible utilizarlo para otros cultivos y explantes con resultados seguramente favorables.
- Se observó que el proceso embriogénico en *B. linanoe* sigue las mismas etapas de desarrollo que un embrión normal, sin embargo en algunas preparaciones se vio que los embriones cotiledonares no germinan, por lo que es necesario probar otras alternativas para conseguirla, a la vez que se requiere de pruebas bioquímicas para dilucidar qué es lo que está pasando con el embrión.
- En ambos sistemas de cultivo se consiguió la síntesis de linalol y acetato de linalol, pero en proporción muy baja, es posible que las condiciones de los sistemas de cultivo generen esta respuesta, por lo que tal vez estresando al tejido sea posible obligarlo a sintetizar más compuestos metabólicos. También es posible que el método de extracción a reflujo genere una pérdida por evaporación de los metabolitos de interés, debido que a las cantidades de masa embrionaria obtenida en cada método no fue suficiente para aplicar el método de extracción por arrastre de vapor y no se pudo hacer una comparación con los rendimientos obtenidos por este método en tallo fresco y fruto.

- Se generó un protocolo de cultivo en el sistema de inmersión temporal, el cual aporta las condiciones y pasos a seguir para producir otros cultivos de interés.

6. LITERATURA CITADA

- 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
- Aitken-Christie, J., and C. Jones. 1987. Towards automation: radiata pine shoot Hedges *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 8: 185-196.
- Albarrán, J., B. Bertrand., M. Lartaud y H. Etienne. 2005. Cycle characteristics in a temporary immersion biorreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 81: 27-36
- Alberts, B., D Bray., J. Lewis., M Raff., K. Roberts and J. D Watson. 1989. Molecular biology of the cell. 2ª Edition. Garland Publishing INC. New York & London pp 1173-1177
- Aragon, C. E., M. Escalona., R. Rodriguez., M. J. Cañal., I. Capote., D. Pina., y J. Gonzalez-Olmedo. 2010. Effect of sucrose, light and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion biorreactors. In vitro Cell Development Biology – Plant 46: 89-94
- Arellano, O. G., S. González B., y E. Sánchez A. 2010. Producción de Linalol y acetato de Linalol durante la regeneración *in vitro* de Linaloe (*Bursera Linanoe*, La Llave), a partir de Cotiledones y Hojas Jóvenes. Revista Chapingo. Serie horticultura. 00:00. En prensa.
- Arellano-Ostoa G., S. González-Bernal., E. Sánchez-Arreola. 2009a. Embriogénesis somática de lináloe (*Bursera linanoe*, La Llave) utilizando cotiledones y hojas jóvenes en expansión como explantes. LV Anual

- Meeting Of (A.S.H.S.) Int. Soc. Trop. Hort. Lara, Venezuela.
- Arellano-Ostoa G., D. Trigo., S. González B., y Sánchez-Arreola E. 2009b. Producción de linalol y de acetato de linalol en el extracto hexánico de callo embriogénico obtenido a partir de cotiledones y hojas jóvenes en expansión de *Bursera linanoe*, *La Llave*. IV Reunión Nacional de Innovación Agrícola y Forestal. Saltillo, Coahuila, México.
- Ascencio-Cabral A., H. Gutiérrez-Pulido., B. Rodríguez-Gray y A. Gutiérrez-Mora. 2008. Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. *Scientia Horticulturae* 118: 155-160
- Bergareche C. y L. Moysset. 1993. El fitocromo In: Azcón-Bieto J. y M. Talón. (eds) *Fisiología y bioquímica vegetal*. (pp. 393-418) McGraw-Hill interamericana España.
- Berlyn, P. G., and J. P. Miksche. 1977. *Botanical microtechnique and cytochemistry*. Iowa State University 2da Edition pp 321
- Bezerra dos Santos, K. G., J. E. de Araújo M., M. C. Moco., and M. H. Bodanese-Zanettini. 2006. Somatic Embryogenesis from Immature Cotyledons of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.): Ontogeny of Somatic Embryos. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 49(1): 49-55
- Bhojwani, S. S., and S. P. Bhatnagar. 1999. *The embryology of angiosperms*. Vikas Publishing house PVT LTD pp 347 4th revised 8 enlarged Edition
- Bonfil, S. C., I. Cajero L., y R. Y. Evans. 2008. Germinación de semillas de seis especies de *Bursera* del centro de México. *Agrociencia* 42: 827-834
- Bonfil, S. C., P. E. Mendoza H., y J. A. Ulloa N. 2007. Enraizamiento y formación de callos en estacas de siete especies del género *Bursera*.

- Agrociencia 41: 103-109.
- Cabasson, C. D., D. Alvard., D. Lamber., P. Ollitruft., and C. Teisson. 1997. Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 50: 33-37
- Carneros, G. E. 2009. Embriogénesis somática en pino piñonero (*Pinus pinea* L.). Universidad de Alcalá. Departamento de biología celular y genética.
- Casal J. J. 2008. Fotomorfogénesis: la luz como factor regulador del crecimiento. in: Azcón-Bieto J. Y M. Talón (eds) *Fundamentos de fisiología vegetal*. (pp 467-479) McGraw-Hill Interamericana.
- 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 Agrararia. Sistemas y Recursos Forestales*. 14: 345-357
- Chacoff N. P., J. M. Morales y M. Vaquera. 2004. Efectos de la fragmentación sobre la aborción y depredación de semillas en el Chaco Serrano. In: Bonfil, S. C., I. Cajero L., y R. Y. Evans. (eds) *Germinación de semillas de seis especies de Bursera del centro de México*. Agrociencia 42: 827-834.
- Chu, I. 1995. Economic analysis of automated micropropagation. In: Aitken Christie J, Kozai T, Smith MAL (eds) *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture* (pp 19–27). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Escalona M., G. Samson., C. Borroto and Y. Desjardins. 2003. *Physiology of*

- effects of temporary immersion biorreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In Vitro Cell Development Biology - Plant*. 39:651-656
- Espinosa, O. D. 2006. Taxonomía y prospección del hábitat de las poblaciones de *Bursera* sect. *Bullockia* con especial énfasis en las especies afines al 'linaloe', *B. aloexylon* (Schiede ex Schlecht.) Engl. Universidad Nacional Autónoma de México. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. BS001. México D. F.
- Etienne H., and M. Berthouly. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215-231
- Etienne, H., M. Lartuad., N. Michaux, F., M. P. Carron., M. Berthouly., and C. Teisson. 1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique. *In Vitro Cell, Development Biology - Plant* 33: 81-87
- Esau K. 1965. *Plant Anatomy*. John Wiley & Sons, INC. USA. pp 607.
- Georgiev, V., A. Marchev., C. Haas., J. Weber., M. Nikolovo., T. Bley., and A. Pablov. 2011. Production of oleanolic and ursolic acids by callus cultures of *Salvia tomentosa* Mill. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 25(4):34-38
- Ibaraki, Y., y K. Kurata. 2001. Automation of somatic embryo production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 65: 179-199.
- Jiménez, R. D. 2008. Linaloe, Aromático Tesoro. *Matria*. 18: 5
- 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
- Lapczynski, A., C. S. Letizia., y A.M. Api. 2008. Addendum to Fragrance material review on linalool. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 190-192
- Lara, A., R. Valverde., y L. Gómez. 2003. Histología de embriones somáticos y brotes adventicios inducidos en hojas de *Psychotrra acuminata*. *Agronomía Costarricense*. 27(1): 37-48
- Letizia, C. S., J. Cochiara., J. Lalko., y A. M. Api. 2003. Fragrance material review on linalool. *Food and Chemical Toxicology*. 41: 943-964
- Li, X. Y. and F H Huang. 1996. Induction of somatic embriogénesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cell Development Biology - Plant* 32: 29-135
- Liao Y. K., and H. V. Amerson. 1995. Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) somatic embryogenesis I. Initiation of embryogenic cultures from immature zygotic embryos. *New Forests*. 10: 145–163
- Mallón, R., P. Covelo., y A. M. Vieitez. 2011. Improving secondary embryogenesis in *Quercus robur*: application of temporary immersion for mass propagation. *Trees* 26: 731-741
- McDonald K. A. and A. P. Jackman. 1989. Biorreactor studies of growth and nutrient utilization in alfalfa suspension cultures. *Plant Cell Reports* 8: 455-458
- Menges E. S. 1991. Seed germination percentage increases with population size in a fragmented prairie species. In: Bonfil, S. C., I. Cajero L., y R. Y. Evans. (eds) Germinación de semillas de seis especies de *Bursera* del

- centro de México. *Agrociencia* 42: 827-834
- Merkle, S. A., P. M. Montello., X. Xia., B. L. Upchurch and D. R. Smith. 2005. Light quality treatments enhance somatic seedling production in three southern pine species. *Tree Physiology* 26: 187-194
- Mordhorst, A. P., M. V. Hartog., M. K. El Tamer., T. Laux., and S. C. de Vries. 2002. Somatic embryogenesis from Arabidopsis shoot apical meristem mutants. *Planta*. 214: 824-836
- Muralidharan, E. M., Gupta, P. K., Mascarenhas A. F. 1989. Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. *Plant Cell Report* 8: 41-43
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Onay, A. 2000. Histology of somatic embryogenesis in culture leaf explants of Pistachio (*Pistacia vera* L.). *Turk Journal of Botany*. 24: 91-95
- Paunescu, A. 2008. Histological investigation of the secondary somatic embryogenesis of *Alyssum borzaeanum* (Brassicaceae). *Phytologia Balcanica* 14(1): 111-117
- Pérez, M., M. A. Bueno., M. Escalona., P. Toorop., R. Rodríguez., y M. J. Cañal. 2013. Temporary Immersion Systems (RITA) for the improvement of coak oak somatic embryogenic culture proliferation and somatic embryo production. *Trees*. 27: 1277-1284
- Piñol M. T. y J. Palazón. 1993. Metabolismo secundario. In: Azcón-Bieto J. y M. Talón. (eds) *Fisiología y bioquímica vegetal*. (pp. 237-284) McGraw-Hill interamericana España.
- Plata, E., A. Ballester., and A. M. Vieitez. 1991. An anatomical study of

- secondary embryogenesis in *Camellia reticulata*. In Vitro Cell Development Biology - Plant. 27: 183-189
- Quiroz-Figueroa F. R., R. Rojas-Herrera., R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas. 2006. Embryo production through somatic embriogénesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell Tissue and Organ Culture 86: 285-301
- Recklinghausen, I. R. von., A. Iwanowaska., H. Kieft., A. P. Mordhorst., J. H. N. Schet., and A. A. M. von Lammeren. 2000. Structure and development of somatic embryo formed in *Arabidopsis thaliana* pt mutante callus cultures derived from seedlings. Protoplasma. 211: 217-224
- Rodríguez, S. A., G. Acevedo H., J. M. Rodríguez D., B. Rodríguez G., J. Cervantes M., y O. A. Castellanos H. 2011. Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of *Agave tequilana* Weber var. Azul. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 104: 271-275
- 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., R. Medina L., y G. Calderón de Rzedowski. 2005. Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la biodiversidad y del endemismo regionales de las especies de *Bursera* (Burseraceae). Acta Botánica Mexicana. 70: 85-111
- Salaj T., J. Moravcikova and J. Salaj. 2005. Somatic embriogénesis in *Pinus nigra* Arn: Some physiological, structural and molecular aspects. Plant Cell Monographs 2: 141-156
- Sánchez-Arreola, E., Cerda-García-Rojas, C. M., Joseph-Nathan, P., Román,

- L. U.; Hernández-Longipinene, J. D. 1995. Derivatives from *Stevia serrata*, *Phytochemistry* 39: 853-857
- Sánchez-Arreola E. 2011. Estudio químico e industrialización del linaloe. *In: Linaloe cultivo y aprovechamiento*. pp: 261-288. Ayala S., J. C. y S. I. Ayala F. (eds). Fundación Produce Puebla, A. C. México.
- Sánchez-Arreola E. 2013. Comunicación personal.
- Sankar-Thomas, Y. D., K. Saare-Surminski., R. Lieberei. 2008. Plant regeneration via somatic embryogenesis of *Camptotheca acuminata* in temporary immersion system (TIS). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95: 163–173
- SAS, Institute. 2002. The SAS system for windows. Release 6.1. SAS Inst., Cary, NC.
- Schoof, H., M. Lenhard., A. Haecker., K. F. X. Mayer., G. Jurgens., y T. Laux. 2000. The Stem cell population of arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA an WUSCHEL genes. *Cell*. 100: 635-644
- Segura J. 1993. Morfogénesis *in vitro*. *In: Azcón-Bieto J. y M. Talón. (eds) Fisiología y bioquímica vegetal. (pp. 381-392) McGrawl-Hill interamericana España.*
- Spalding, E. P., and K. M. Folta. 2005. Illuminating topics in plant photobiology. *Plant, Cell and Environment* 28: 39-53
- Taiz L, y E. Zeiger. 2006. Fisiología vegetal. Publicacions de la Universitat Jaume. España. 1338 p
- Thanasomboon, R., D. Waraho., S. Cheevadhanarak., and A. Meechai. 2012. Construction of synthetic Escherichia coli production s-linalool. *Procedia*

Computer Science. 11: 88-95

- Tirado, J. M., E. J. Naranjo., y L. Atehortúa. 2005. Propagación *in vitro* de *Phalaenopsis* (Orchidacea) a partir de protocormos, mediante el sistema de inmersión temporal RITA. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 7(1): 25-31
- Toledo, C. A. 1982. El género *Bursera* en el estado de Guerrero. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 182 pp. *In*: Becerra J X and K Noge. (eds) The mexican roots of the indian lavender tree. *Acta Botánica Mexicana* 91: 27-36
- Verdeil, J. L., L. Alemanno., N. Niemanak., y T. J. Taranbarger. 2007. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: Dependence versus autonomy?. *Trends in Plant Science*. 12(16): 245-252
- Vieitez, A. M., E. Corredoira., T. Martínez, M. C. San-José, C. Sánchez., S. Valladares., N. Vidal., and A. Ballester. 2011. Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement. *European Journal of Forest Research*. 131: 519-539
- Wilhelm, E. 2000. Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.). *In Vitro Cell and Development Biology - Plant* 36: 349–357
- Zdravkovic-Korac, S., D. Calic-Dragosavac., B. Uzelac., D. Janosevic., S. Budimir., B. vinterhalter., and D. Vinterharter. 2008. Secondary somatic embryogenesis versus caulogenesis from somatic embryos of *Aesculus carnea* Hayne.: developmental stage impact. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 94: 225-231
- Zegzouti, R., M. F. Arnold., and J. M. Favre. 2001. Histological investigation of

the multiplication step in secondary somatic embryogenesis of *Quercus robur* L. *Annals of Forest. Science.* 58: 681-690

Zobayed S. M. A. 2006. Aeration in plant tissue culture: *in*: Plant tissue culture engineering. S D Gupta, Y Ibaraki (eds). Springer. Netherlands. pp:313-327.

Ziv, M. 1995. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Acta Horticulturae.* 393: 25–38