



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

**REGENERACIÓN DE PLANTAS DE *Tigridia pavonia* (L.f.) DC., VÍA
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA**

PRESENTA:

HUGO GONZÁLEZ GONZÁLEZ

No. Cuenta 0524485

33^a Generación

MODALIDAD: TESIS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. AMAURY MARTÍN ARZATE FERNÁNDEZ

ASESORES:

DR. JOSÉ LUIS PIÑA ESCUTIA

DR. LUIS MIGUEL VÁZQUEZ GARCÍA

ENERO, 2012

CAMPUS UNIVERSITARIO “EL CERRILLO”, TOLUCA, MÉXICO





AGRADECIMIENTOS

A mis padres Macario y Jacinta, por el amor incondicional, y el esfuerzo realizado para terminar mis estudios. Siempre hay una luz y una esperanza.

Al Dr. Amaury M. Arzate Fernández, por enseñarme la dicha de conocer la investigación a costa de la lectura, y sobre todo por sus sabios consejos que forjaron mi realización como estudiante.

Al Dr. Piña Escutia, por las experiencias compartidas en el tema, y saber que encontré un amigo más en el LBMV, Gracias por tu sabiduría Piña.

Al Dr. Luis Miguel Vázquez García, por las observaciones realizadas en el presente trabajo, y por enseñarme que la investigación se crea a base de un gran equipo.

A la Bióloga Greta Hanako, por enseñarme que la sabiduría no es provechosa si no se comparte, y al Técnico Miguel por su atención brindada para los análisis histológicos. Ambos del Colegio de Postgraduados.

A la Dra. Aída Carrillo de la Universidad Autónoma de Chapingo, por compartirme su sabiduría e inteligencia, ya que me ayudo a reforzar mis conocimientos.

A la RED TIGRIDIA (SINAREFI, México), por el apoyo económico para los análisis histológicos.

A la familia Romero González (Francisca, Alfredo, Yulis y Kevin). Porque siempre los vi como mis padres y hermanos, por su apoyo, su comprensión y por mostrarme sus brazos abiertos siempre.



A mis tíos Fidel y Catalina, siempre me apoyaron desde mi inserción en la UAEMéx. Gracias por apoyarme en la elección de la que sería mi carrera, así como creer en un sueño y ser parte de mi superación.

A nuestra máxima casa de estudios, UAEMéx, a mi segunda casa la Facultad de Ciencias Agrícolas y al equipo de LBMV, por compartir sus sabios conocimientos, y por establecer un camino de investigación, amplio, creado por cada uno de ustedes: Lupita, Gaby, Lauris, Miry, Magy, Mary, Amy, Karen, Piña, Adolfo, Omar. Gracias a todos y cada uno de ustedes.

A mis grandes amigos de aventuras y experiencias; Chabela, siempre encontraste esa alegría aun en las tristezas y por saber maquillar el dolor. Adrián, por permitirme conocer a una persona con un gran corazón y un espíritu. Rojas, que sin duda nunca olvidare lo divertido de la vida contigo. Coca, nunca estuve solo, a pesar de los grandes retos que en la vida se nos presentaron, gracias por tu experiencia y por ayudarme a no cometer tantos errores en esta vida.

A las familias: Martínez, González, Gómez Romero, Rojas Carranza, González Del Bocquer, Ventura Bonifacio y Luís García, por abrirme las puertas de su hogar, y me adoptaron como un integrante más de su familia. Siempre tendrán un espacio en mi corazón.

No podrían faltar los amigos que con el tiempo muestran un vínculo así a mi persona: Chio, Becky, Pawys, Ely, Lucha, Doña ara, Carlos, Ocaña, Daniela, Miry, Miriam, Gustavo, Ros. A Jimy y a Yas, de la sala de computo.

Gracias a todos los que de alguna forma contribuyeron con algo así a mi persona.



DEDICATORIAS

A quien me inculco desde niño el cariño por el campo, el cariño por la agronomía, y por creer y soñar que nuestro futuro siempre será un Ingeniero Agrónomo, a ti abuelo Chinto, que dios te tenga consigo.

A mis abuelos paternos y maternos, mis padres, mis hermanos, Cuñados y cuñada, y a los cachorros, simplemente por ser mucho más que mi familia, este trabajo también es suyo; “el camino a un no termina, si en la vereda no hay luz, es mi deber buscarla, sino la encuentro déjenme crearla...Hugo González”.

A Ivett V. B. por estar siempre a mi lado en distintos escenarios, como amiga, compañera y por ayudarme a crecer como persona y sentir una mano más en el andar de nuestra carrera, Te Amo. ” Un amigo no es quien se queda cuando todos se van, sino quien te lleva consigo siempre”.



*“La sabiduría no se destruye a través del tiempo,
se construye a base de esfuerzo, la entrega,
y sobre todo del éxito que logramos con nuestro conocimiento,
humildad, que el campo y la tierra nos inculca,
en nuestra Facultad de Ciencias Agrícolas”.... Hugo González.*



*“La sabiduría se empieza sembrándola en la tierra de nuestra mente,
y se cosecha con el andar de nuestra sociedad,
cultivando día con día el conocimiento y valor
de nuestra Universidad Autónoma de Estado de México”... Hugo González*



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	iii
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	viii
ABSTRACT	ix
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general	2
1.2 Objetivos específicos	3
1.3 Hipótesis	3
II. JUSTIFICACION	4
III. REVISIÓN DE LITERATURA	5
3.1 Origen y distribución	5
3.2 Usos	5
3.3 Mecanismos de reproducción en <i>T. pavonia</i>	6
3.4 Cultivo <i>in vitro</i>	6
3.4.1 Métodos de propagación vegetativa <i>in vitro</i>	7
3.4.1.1 Embriogénesis somática	7
3.4.1.2 Tipos de embriogénesis somática	7
3.5 Cultivo <i>in vitro</i> en <i>Tigridia pavonia</i>	10
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1 Ubicación de la investigación	12
4.2 Material biológico experimental	12



4.3 Desinfección de semillas	12
4.4 Embriogénesis somática	13
Etapa 1: Germinación de embriones cigóticos	13
Etapa 2: Inducción de callos.....	14
Etapa 3: Inducción de embriones somáticos	15
Etapa 4: Proliferación de embriones somáticos	16
Etapa 5: Maduración de embriones somáticos	16
Etapa 6: Germinación de embriones somáticos	17
4.5 Adaptación de <i>vitro</i> plantas	17
4.6 Análisis histológico.....	18
4.7 Análisis estadísticos y variables a estudiar	19
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	20
5.1 Embriogénesis somática.....	20
Etapa 1: Germinación de embriones cigóticos inmaduros.....	20
Etapa 2: Inducción de callos.....	20
Etapa 3: Inducción de embriones somáticos	21
Etapa 4: Proliferación de embriones somáticos	24
Etapa 5: Maduración de embriones somáticos	24
Etapa 6: Germinación de embriones somáticos	27
5.2 Adaptación de <i>vitro</i> plantas	27
5.3 Análisis histológico.....	29
VI. CONCLUSIONES	32
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	33



LISTA DE CUADROS

1. Componentes de los medios basales utilizados en la inducción de embriones somáticos.....	14
2. Tratamientos evaluados para la inducción de embriones somáticos.	15
3. Descripción de los tratamientos para inducir la maduración de los embriones somáticos.....	16
4. Respuesta a BA en la inducción de embriones somáticos.	24
5. Respuesta a, AG ₃ y a condiciones luz y oscuridad en la maduración de embriones somáticos.....	26

LISTA DE FIGURAS

1. <i>Tigridia pavonia</i> , variedad carolina, especie utilizada para esta investigación.....	12
2. Eje hipocótilo radicular utilizado como explante en la inducción de callo.....	15
3. Inducción de embriones somáticos globulares evaluados a distintas semanas de desarrollo	22
4. Etapas en la obtención de embriones somáticos.....	28
5. Histología de un embrión somático de <i>Tigridia pavonia</i>	30



ABSTRACT

Tigridia pavonia (L.f.) DC. PLANT REGENERATION BY SOMATIC EMBRYOGENESIS

Hugo González González, José Luis Piña Escutia, Luis Miguel Vázquez García and
Amaury M. Arzate Fernández¹.

¹Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca. Km 11.5. Entronque al Cerrillo. Centro Universitario “El Cerrillo”, Piedras blancas, municipio de Toluca, Estado de México, C.P. 50200, Tel. (fax): (722) 2965518 Ext. 144. E-mail: amaury1963@yahoo.com.

Tigridia pavonia (L.f.) DC, belongs to the Iridaceae family. Generally, it is propagated by two ways: seeds and bulbs. However, seeds have low germination rate; regarding the bulb, after two years it is possible to obtain only four bulbs. Commercially important species or endangered species can propagate massively by *in vitro* propagation techniques, such as somatic embryogenesis (SE). The induction of somatic embryos was performed in six stages: Stage 1: germination of zygotic embryo was obtained 90% germination in six weeks. Stage 2: callus induction was observed at the seventh week of culture, using as explant, hypocotyls root axis *in vitro* plants. Stage 3: induction of somatic embryos (ES), was achieved by 42% in the four week, the start of the culture, in a medium without plant growth regulators (PGR). Stage 4: proliferation of ES was maintained through week 12 after initiation of culture. Stage 5: maturation of ES remained for six weeks, MS 100% medium with 3 mg L⁻¹ gibberellic acid, light conditions, obtaining average of 10.9 embryos per explant. Stage 6: germination of somatic embryos was obtained 100% response to the seventh week after starting the culture. Adaptation of *in vitro* plants in the greenhouse was achieved in 100% at three



weeks. Histological analysis corroborated the cellular origin of somatic embryos. On average 10.9 plants were obtained from an explant at 39 weeks, exceeding the natural spread of *Tigridia pavonia*.

Keywords: *Tigridia pavonia*, somatic embryogenesis, histological analysis, gibberellic acid, benzilaminopurine.



RESUMEN

REGENERACIÓN DE PLANTAS DE *Tigridia pavonia* (L.f.) DC., VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

Hugo González González, José Luis Piña Escutia, Luis Miguel Vázquez García y Amaury M. Arzate Fernández¹.

¹Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca. Km 11.5. Entronque al Cerrillo. Centro Universitario “El Cerrillo”, Piedras blancas, municipio de Toluca, Estado de México, C.P. 50200, Tel. (fax): (722) 2965518 Ext. 144. E-mail: amaury1963@yahoo.com.

Tigridia pavonia (L.f.) DC, pertenece a la familia Iridaceae. Se reproduce mediante dos formas: por semilla y por bulbo. Sin embargo con semillas se tiene una baja tasa de germinación, mientras que por bulbo, después de dos años se obtienen cuatro bulbos. Las técnicas de propagación *in vitro* como la embriogénesis somática permiten propagar de forma masiva, especies de importancia comercial o en peligro de extinción. La inducción de embriogénesis somática en esta investigación se realizó en seis etapas: Etapa 1: germinación de embriones cigóticos, se obtuvo un 90% de germinación en seis semanas. Etapa 2: inducción de callos, se observó a la séptima semana de cultivo, utilizando como explante, el eje hipocótilo radicular de plantas *in vitro*. Etapa 3: inducción de embriones somáticos (ES), se logró un 42% a la cuarta semana, de iniciado el cultivo, en un medio sin reguladores de crecimiento vegetal (RCV). Etapa 4: proliferación de ES, se mantuvo hasta la semana 12, después de iniciado el cultivo. Etapa 5: maduración de ES, se mantuvo por seis semanas, en medio MS al 100% con 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico, en condiciones de luz, obteniendo un promedio de 10.9 embriones por explante. Etapa 6: germinación de los embriones somáticos, se obtuvo



100% de respuesta a la séptima semana de iniciado el cultivo. La adaptación de las *vitro* plantas a condiciones de invernadero se logró en un 100%, a las tres semanas. El análisis histológico permitió corroborar el origen celular de los embriones somáticos. En promedio se obtuvieron 10.9 plantas a partir de un explante, en 39 semanas, superando la propagación natural de *Tigridia pavonia*.

Palabras clave: *Tigridia pavonia*, embriogénesis somática, análisis histológico, ácido giberelico, bencilaminopurina.



I. INTRODUCCIÓN

El género *Tigridia* pertenece a la familia Iridaceae y está representado por 40 especies, una de las cuales es *Tigridia pavonia* (L.f) DC. En la actualidad, esta especie se encuentra distribuida en toda la República Mexicana, así como en diferentes países de Europa, Asia y Australia. *T. pavonia* se reproduce mediante dos formas: por semillas y/o por medio de bulbos. Sin embargo, el uso de semillas no es un método de propagación práctico debido a la baja tasa de germinación obteniendo a los dos años 94 semillas, de una sola semilla, aclarando que no todas las semillas germinan. Adicionalmente, para obtener bulbos de buena calidad, se requieren de dos a tres años, debido al lento crecimiento de los mismos, obteniendo cuatro bulbos por cada semilla (Vázquez-García *et al.*, 2001).

El cultivo de tejidos o cultivo *in vitro*, es considerado como una alternativa eficaz, respecto a los métodos convencionales de propagación vegetativa, con el objetivo de aumentar la tasa de multiplicación de los genotipos deseados, un claro ejemplo es la embriogénesis somática, una técnica, que constituye una herramienta en el mejoramiento genético y propagación. Con un adecuado manejo de los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), como: benzilaminopurina (BA), ácido naftalenacético (ANA), ácido abcísico (ABA), ácido 2,4-dichlorofenoxiacético (2,4-D), ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), se puede llegar a obtener embriones somáticos en diferentes especies de iridáceas entre los cuales se pueden citar a: *Babiana*, *Cipura*, *Crococomia*, *Crocus*, *Dierama*, *Freesia*, *Gladiolus*, *Iris*, *Ixia*, *Schizostylis*, *Sparaxis*, *Watsonia* (Glendon *et al.*, 2009), A diferentes temperaturas, medios de cultivo y tipos de estrés se



puede obtener embriogénesis somática, e incluso utilizando embriones cigóticos inmaduros en distintas etapas se ha logrado obtener embriogénesis somática (Zavattieri *et al.*, 2010).

Existen dos tipos de embriogénesis somática: embriogénesis somática directa; en este caso los embriones se obtienen de una única célula inducida, y embriogénesis somática indirecta; este tipo de embriogénesis se caracteriza por una formación de callo, seguido de una etapa de diferenciación de los embriones somáticos a partir de esa masa de células desdiferenciadas (Santacreo, 1992; citado por Paz-Ramírez, 2000). Así, estas estrategias proveen herramientas útiles que ayudarán a la propagación masiva de especies con potencial ornamental y con una lenta propagación, aunque los procedimientos de mejoramiento convencional no serán remplazados por estas tecnologías, sí permitirá al mejorador determinar que técnica de propagación es más eficiente, además de valorar el material vegetal para su propagación. Actualmente México podría perfilarse como líder en propagación de especies cuyo origen es nuestro país, por ello es necesario tener esquemas de clonación o reproducción eficientes. Así poder reproducir masivamente a *Tigridia pavonia* por embriogénesis somática.

En base a lo anterior los objetivos del presente trabajo son:

1.1 Objetivo General

- Regenerar plantas de *Tigridia pavonia*, vía embriogénesis somática.



1.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de benzilaminopurina (BA), en la inducción de embriones somáticos.
- Evaluar el efecto de ácido giberelico (AG^3), en la maduración los embriones somáticos obtenidos.
- Adaptar las *vitro* plantas a condiciones de invernadero.
- Verificar el origen celular de los embriones somáticos obtenidos

1.3 Hipótesis

- Es posible regenerar plantas de *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. por embriogénesis somática.



II. JUSTIFICACIÓN

La flor de tigre o conocida comúnmente como *Tigridia*, es una especie silvestre nativa de México y de la cual no hay registros de su reproducción comercial, pero en Europa, Asia y Australia aparecen en catálogos de horticultura como planta para jardinería (Arzate-Fernandez *et al.*, 2008). *Tigridia pavonia* se reproduce mediante dos formas: por semilla y por bulbo. Sin embargo el uso de semillas no es un método de propagación práctico debido a la baja tasa de germinación de 7%, es decir que una semilla genera una planta, florece y se cosechan 94 semillas en dos años, agregando que no todas germinan. Por otra parte, para obtener bulbos de buena calidad, se requieren de dos a tres años, debido al lento crecimiento de los mismos obteniendo cuatro bulbos en dos años (Vázquez-García *et al.*, 2001).

La propagación *in vitro* es la puerta a la clonación masiva de distintas especies que en muchos casos están en peligro de extinción o son difíciles de propagar. Es por ello que se han creado métodos como la embriogénesis somática, al tener una enorme capacidad de multiplicación, permite obtener estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente durante largo tiempo.

Así, estas estrategias proveen herramientas útiles que ayudaran a la obtención de un protocolo de propagación eficiente, aunque los procedimientos convencionales no serán remplazados por estas tecnologías, sí permitirá al investigador determinar que la embriogénesis somática es una técnica viable en la reproducción masiva de plantas, como, *Tigridia pavonia*.



III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Origen y distribución

Tigridia pavonia, es una especie nativa de México que se puede encontrar en forma silvestre, en bosque de encino, jardines de traspatio y al lado de terrenos de cultivo, y aún en proceso de domesticación, en toda la República Mexicana (Molseed, 1970). México es considerado como el centro de mayor diversidad genética de esta especie, a nivel nacional se ubica en 18 estados, y en nuestra Entidad Federativa se localiza en 22 municipios (Vázquez-García *et al.*, 2010), sin embargo su presencia se ha extendido en diferentes países de Europa y Asia.

3.2 Usos

En México, *T. pavonia* fue de gran importancia entre los guerreros aztecas debido a la belleza de sus flores, las cuales eran utilizadas en la elaboración de coronas y guirnaldas honoríficas, como planta ornamental, en la alimentación y con fines medicinales (Piña-Escutia *et al.*, 2010 a, 2010 b).

En la actualidad, el colorido de su flor, su morfología, así como la abundante variabilidad de colores, hacen de esta especie un atractivo recurso florícola, como planta ornamental para jardines y macetería (Leszczyńska-Borys *et al.*, 1995).



3.3 Mecanismos de reproducción en *T. pavonia*

T. pavonia se reproduce de forma: sexual mediante semilla y asexual mediante bulbo, sin embargo el uso de semillas no es un método de propagación práctico debido a la baja tasa de germinación de 7%, es decir que una semilla genera una planta, florece y se cosechan 94 semillas en dos años, aunado que no todas germinan. Por otra parte, para obtener bulbos de buena calidad, se requieren de dos a tres años, debido al lento crecimiento de los mismos obteniendo cuatro bulbos en dos años (Vázquez-García *et al.*, 2001).

3.4 Cultivo *in vitro*

La expresión cultivo *in vitro* de plantas significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia y el control de los factores que afectan el crecimiento.

El cultivo *in vitro* se basa en el principio de la totipotencia, el cual establece que las células son autosuficientes y que en principio tienen la capacidad de regenerar una planta completa (Pierik, 1988). Con el uso de citocininas y auxinas se puede obtener respuesta en los explantes y, manipulando la proporción de éstos dos reguladores de crecimiento, los explantes pueden desarrollar plantas directamente, o bien, callos que posteriormente se diferencian aleatoriamente en tejidos vasculares (brotes y/o raíces). La micropropagación es una alternativa a la propagación convencional, ya que utiliza explantes como yemas apicales o laterales, segmentos de hoja, segmentos de raíz y/o



protoplastos, en condiciones asépticas, donde pueden controlar las condiciones como: luz, temperatura y nutrimentos (Alonso, 2002).

3.4.1 Métodos de propagación vegetativa *in vitro*

Los métodos de propagación vegetativa que se seleccionan en la multiplicación *in vitro* dependen de la planta que se va a multiplicar, de los tejidos, y de la técnica de micropropagación a utilizar (Alonso, 2002). La regeneración puede ocurrir de forma adventicia o mediante embriogénesis somática (Alonso, 2002).

3.4.1.1 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática (ES), es el proceso en el cual las células somáticas se desarrollan para dar lugar a plantas diferenciadas pasando por los estados embriogénicos pero sin la fusión de gametos. Los embriones somáticos proceden de células individuales, son bipolares y no están conectados al sistema vascular de la planta madre. La embriogénesis puede aumentar la eficacia en la formación de plantas al producirse con menor número de pasos, en mayores cantidades, con mayor uniformidad tanto morfológica como citológicamente (Alonso, 2002).

3.4.1.2 Tipos de embriogénesis somática

Según Santacreo (1992), citado por Paz-Ramírez, (2000), existen dos tipos de embriogénesis somática:



- **Embriogénesis somática directa o de baja frecuencia:** donde los embriones se diferencian a partir de una célula o tejido, sin que se produzca una formación de callo. En este caso los embriones se obtienen de una única célula inducida.
- **Embriogénesis somática indirecta o de alta frecuencia:** los embriones somáticos son obtenidos por la multiplicación de las células inducidas. Este tipo de embriogénesis se caracteriza por una fuerte formación de callo en la primera etapa, seguido de una etapa de diferenciación de los embriones somáticos a partir de esa masa de células parenquimatosas.

La embriogénesis somática es una herramienta útil para la propagación masiva y programas de transformación genética, la formación de los embriones somáticos es muy sensible a las condiciones de cultivo tales como: (a) composición del medio de cultivo, (b) reguladores de crecimiento, (c) ambiente físico de cultivo, (c) fuente del explante (Fuentes *et al.*, 2000).

(a) Medio de cultivo: La inducción de embriogénesis somática es una respuesta fisiológica en función al medio de cultivo; Klimaszemskak *et al.* (2001) reportaron embriogénesis somática con distintos medios basales utilizados en *Pinus strobus* L., Carneros (2009) en *Pinus pinea* L. Por otro lado Park *et al.* (2006) y Mejia (2003), reportaron la utilización de diferentes concentraciones de macro y micronutrientes de la cual se obtuvo una respuesta diferente, por cada combinación de elementos utilizados para una sola especie, obteniendo embriogénesis somática en todos los medios utilizados. Así mismo, Malik (2008) reportó la utilización de medio de cultivo, sólido y líquido, para la obtención de embriones somáticos en *Narcissus* L.



(b) Reguladores de crecimiento: Kikuchi *et al.* (2006), reportaron embriogénesis somática en zanahoria, adicionando ácido abscísico (ABA) y alta presión osmótica con sacarosa; con respecto al ABA determinaron que contribuye a la obtención de embriogénesis en 29% y 80% en la presión osmótica con sacarosa. A su vez examinaron la expresión de genes C-ABI3, ECP31 y EC63; dónde observaron que el ABA regula la expresión de dichos genes en zanahoria los cuales están relacionados con la obtención de células embriogénicas. También se ha reportado que con el uso de bencilaminopurina (BA) y ácido naftalenacético (ANA), en iridáceas es posible la obtención de ES (Al-Gabbiesh *et al.*, 2006; Emek y Erdag, 2007; Glendon *et al.*, 2009; Blazquez *et al.*, 2009; Sharifi *et al.*, 2010; Demeter *et al.*, 2010). Así mismo se ha reportado que la adición de ácido giberelico (AG_3), promueve la embriogénesis somática, como se ha descrito en *Iris germánica*, adicionando 1 mg L^{-1} de AG_3 , (Shimizu *et al.*, 1997), también se ha reportado la adición de AG_3 es en *Crocus sativus*, con 25 mg L^{-1} obteniendo un 80% de embriones somáticos (Ebrahimzadeh *et al.*, 2000).

(c) Ambiente físico de cultivo: a una temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ se puede inducir embriogénesis somática en zanahoria a la tercera semana de cultivo teniendo 17% de formación de embriones (Kamada *et al.*, 1994). Teniendo una temperatura de $2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 días en carbón activado y la presencia de concentraciones mínimas de Ca^{+2} , se indujo embriogénesis, derivadas de ápices de brotes en *Pinus patula* (Malabadi y Van Staden, 2006, citados por Zavattieri *et al.*, 2010). Lincy *et al.* (2009), encontraron que un periodo de estrés causado por la deshidratación, fue favorable para inducir la embriogénesis somática a partir de cultivos de callos de jengibre (*Zingiber officinale*). También es necesario saber a qué condición se encuentra el medio, en luz o en



obscuridad, ya que según lo reportado por Shili y Ajlouni (2000), se obtuvo 90% de respuesta en la inducción de embriones somáticos en luz, que en los tratamientos en obscuridad, previamente la inducción de callos se mantuvo en obscuridad, en *Iris nigricans*.

(d) Fuente de explante: en la mayoría de la especies la embriogénesis somática se obtiene a partir de embriones cigóticos inmaduros, por ello es necesario establecer una estrategia al producir líneas embriogénicas a partir de semilla procedentes de cruzamientos controlados y crioconservar las mismas mientras se evalúan algunas plantas (Celestino *et al.*, 2005). Vélchez *et al.* (2002), mostraron la obtención de embriones somáticos utilizando embriones cigóticos inmaduros de *Psidium guajava* de 25-35 días después de la antesis.

Al obtener embriones somáticos es necesario saber la etapa en la que se encuentran para poder transferirlos al medio de conversión a plantas y así obtener un rendimiento mayor en cuanto a la germinación de ES, por ello es necesario un análisis histológico (Lara *et al.*, 2003; Blazquez *et al.*, 2009).

3.5 Cultivo *in vitro* en *Tigridia pavonia*

Piña-Escutia *et al.* (2010a), describieron un protocolo eficiente para la regeneración de plantas a partir de explantes de escamas de bulbo de *T. pavonia*, además, realizaron un análisis ISSR (Inter Secuencias Simples Repetidas), para determinar la fidelidad genética de las plantas regeneradas. En sus resultados, reportaron un total de 48 plantas por bulbo en un período de cinco meses (un promedio de 12 escamas por bulbo y cuatro



plantas por escama), llegando a la conclusión que se obtienen cuatro plantas por explante. En cuanto al análisis ISSR, no revelaron ningún tipo de polimorfismo entre las plantas regeneradas *in vitro* de *T. pavonia* y la planta madre, indicando la naturaleza clonal de la progenie. Esta observación constituye una ventaja para el procedimiento de regeneración *in vitro*, ya que minimiza el riesgo de la variación genética.



IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación de la investigación

El desarrollo del presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, localizada en al Campus Universitario el Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México.

4.2 Material biológico experimental

Se realizaron autopolinizaciones en plantas de *T. pavonia* de la variedad Carolina (Figura 1 a y b), de las cuales se utilizaron embriones cigóticos colectados a los 80 días después de la polinización (Figura 1 c).



Figura 1. a, *Tigridia pavonia*, variedad carolina, especie utilizada para esta investigación. b, estilo (flecha) de *Tigridia pavonia*, autopolinizando a las 8 am. c, embrión cigótico extraído de la semilla.

4.3 Desinfección de semillas

Las semillas se desinfectaron con agua corriente y jabón antibacterial por 15 minutos. En condiciones de asepsia se colocaron en etanol al 70% durante dos minutos, se



pasaron a hipoclorito de calcio al 2.5% por 10 minutos, posteriormente en hipoclorito de sodio al 2% durante cinco minutos, y por último se enjuagaron dos veces con agua destilada esterilizada, y se colocaron en un tercer frasco con agua destilada esterilizada, hasta su uso. De la semilla colectada y desinfectada, se extrajo el embrión cigótico (Figura 1c), con ayuda de unas pinzas y de un bisturí, durante la extracción se auxilió de un microscopio estereoscópico.

4.4 Embriogénesis somática

En el presente trabajo la obtención de embriones somáticos se llevó a cabo en seis etapas. Los medios basales son los descritos en el cuadro 1.

La concentración de medios descritos en la cuadro 1, muestran el 100% de los medios, MS y mLV. Para el caso del medio mLV al 50%, se utilizaron los macronutrientes a la mitad de su concentración, y micronutrientes y vitaminas completos.

Etapa 1: Germinación de embriones cigóticos.

Se utilizaron 200 embriones cigóticos colectados a los 80 días, cultivados en un medio mLV, al 100% de concentración,(Cuadro 1), adicionado con 10 g L⁻¹ de sacarosa, se ajustó a un pH de 5.7 ± 0.1 , cultivados en obscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante seis semanas.



Cuadro 1. Componentes de los medios basales utilizados en la inducción de embriones somáticos, Murashige y Skoog (1962), medio mLV Litvay modificado por Klimaszewska, *et al.*, (2001), MA= Macronutrientes, MC= Micronutrientes, V= Vitaminas.

Medios basales utilizados			
	Elementos mg L ⁻¹	MS	mLV
MA	NH ₄ NO ₃	1 650	825
	KNO ₃	1 900	950
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	925
	KH ₂ PO ₄	170	170
	CaCl ₂ 2H ₂ O	440	11
MC	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8
	Na ₂ EDTA	37.3	37.3
	H ₃ BO ₃	6.2	31
	MnSO ₄ .H ₂ O	22.3	21
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	43
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25	1.25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.5
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.125
	KI	0.83	4.15
	V	Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine		0.5	0.1
Thiamine HCl		0.1	0.1
myo-Inositol		100	100
Gelrite		2 500	4 000
Caseina Hidrolizada			1 000

Etapa 2: Inducción de callos

De las plántulas obtenidas en la germinación de los embriones cigóticos en la etapa 1, se seccionó la zona del eje hipocotilo radicular (Figura 2). Para inducir la formación de callo los explantes fueron cultivados en el medio mLV al 50%, suplementado con 0.5 g L⁻¹ de L-glutamina, 10 g L⁻¹ de sacarosa y 1 mg L⁻¹ de ABA, se ajustó a un pH de 5.7 ±



0.1, cultivados durante siete semanas en condiciones de obscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

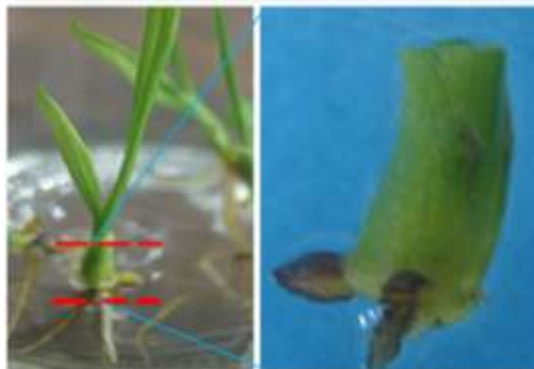


Figura 2. Eje hipocotilo radicular utilizado como explante en la inducción de callo.

Etapa 3: Inducción de embriones somáticos

Los callos inducidos en la etapa 2, fueron cultivados en el medio mL_V, al 50%, suplementado con 20 g L^{-1} de sacarosa, como tratamientos se utilizó BA a diferentes concentraciones (Cuadro 2), se ajustaron a un pH de 5.7 ± 0.1 , en condiciones de obscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Se evaluó el porcentaje de inducción a las 2, 4, 8 y 12 semanas. También se evaluó la respuesta a BA en la inducción de embriones somáticos, por tratamiento.

Cuadro 2. Tratamientos evaluados para la inducción de embriones somáticos.

Tratamientos	
(1)	Sin RCV
(2)	3 mg L^{-1} BA
(3)	6 mg L^{-1} BA



Etapa 4: Proliferación de embriones somáticos

Se utilizaron los explantes con presencia de embriones somáticos, para cultivarlos en el medio mL_V al 50% suplementado con 0.5 g L⁻¹ de L-glutamina, 10 g L⁻¹ de sacarosa, se ajustó a un pH de 5.7 ± 0.1, cultivados durante 12 semanas en condiciones de obscuridad a una temperatura de 25 ± 2°C, con un subcultivo a la semana seis.

Etapa 5: Maduración de embriones somáticos

En esta etapa se realizaron dos experimentos por separado (Cuadro 3), para lograr la maduración de los embriones somáticos obtenidos en la etapa anterior.

Cuadro 3. Descripción de los tratamientos para inducir la maduración de los embriones somáticos de ambos experimentos. o= obscuridad, l= Luz.

Experimento	RCV		Condición
	ANA mg L ⁻¹	BA mg L ⁻¹	
1	0.1	0.1	o
	0.1	0.5	o
	0.1	1	o
	0.5	0.1	o
	0.5	0.5	o
	0.5	1	o
2	AG ₃ mg L ⁻¹		
	1.5		l
	1.5		o
	3		l
	3		o
	6		l
	6		o

En el primer experimento se probaron diferentes combinaciones ANA, y BA, teniendo seis combinaciones (Cuadro 3), con 10 explantes en cada combinación. En el segundo



experimento se evaluaron tres concentraciones AG₃, así como las condiciones de luz y oscuridad, teniendo seis combinaciones (Cuadro 3), con 10 explantes cada combinación. Ambos experimentos en un medio MS al 100% suplementado con 30 g L⁻¹ sacarosa, 1 mg L⁻¹ de carbón activado, se ajustaron a un pH de 5.7 ± 0.1, cultivados a una temperatura de 25 ± 2°C, por seis semanas.

Etapa 6: Germinación de embriones somáticos

Los embriones somáticos obtenidos en la etapa anterior, se separaron fácilmente del explante madre y se subcultivaron a un medio MS al 100%, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 2.5 g L⁻¹ de Gel Rite, 1g L⁻¹ de Carbón Activado, se ajustó a un pH de 5.7 ± 0.1. Cultivados en luz a una temperatura de 25 ± 2°C, durante seis semanas.

4.5 Adaptación de *vitro* plantas

La adaptación de las *vitro* plantas a condiciones medio ambientales se llevó a cabo con plantas de una altura promedio de 15 cm y un sistema radicular bien desarrollado, los cuales fueron retiradas de los frascos de vidrio, se transfirieron a condiciones *ex vitro*. Para tal efecto se lavaron las raíces con agua destilada y se colocaron en macetas de plástico (25cm³), con un sustrato (compost y agrolita 1:1) y se cubrieron con una bolsa transparente de polietileno (300 cm³), fijadas a la maceta con alupak, haciendo perforaciones diarias a la bolsa. Posteriormente a la semana se eliminó la bolsa y se transfirieron las plantas a un invernadero, evaluando la adaptación hasta la tercer semana.



4.6 Análisis histológico

Para corroborar el origen celular de los embriones somáticos formados, se tomaron seis embriones somáticos en distintas etapas de desarrollo, para realizar dos tipos de análisis:

a) Microscopia de luz: Se fijaron las muestras en FAA (Formalina 10%, Acido acético 5%, Alcohol 52%, Agua 33%) por 24 h. Una vez fijado el material se deshidrató en alcohol en orden ascendente (30%, 40%, 50%, 70%+ Eocina, 89%, 100%, 100%, 50%+ Xileno 50%), posteriormente tres lavados con Xileno absoluto. Luego se pasaron en parafina, para posteriormente realizar cortes longitudinales a 10 micras de grosor. Los cortes se tiñeron primero con safranina rojo 0.05% de 2 a 24 hrs y después con verde fijo al 0.12%, una vez teñidos los cortes histológicos se montaron en bálsamo de Canadá, colocando una gota en el portaobjetos, posteriormente se monta el corte sobre el bálsamo y finalmente se coloca el cubreobjetos, por último se observó en un microscopio óptico.

b) Microscopia electrónica de barrido: Fijación con glutaraldehído al 2.5%, posteriormente se realizan los cortes manuales, con una navaja de afeitar, apoyados por un microscopio estereoscópico, se realizan tres lavados en un buffer de fosfatos. La deshidratación se llevo a cabo en alcohol en orden ascendente (30%, 40% - 100%) por 50 minutos en cada porcentaje, se realizó un secado a punto crítico con CO₂ por una hora. El montaje de las muestras se hizo en un bomba de vacío, para recubrir las muestras con oro y posteriormente observar y realizar toma de fotografías con un microscopio electrónico de Barrido (Jeol JSM-6390).



4.7 Análisis estadísticos y variables a estudiar

Para el análisis de datos, se realizó con el paquete estadístico “Menú”, de la Universidad de Nuevo León, las variables evaluadas fueron:

- Porcentaje de germinación de embriones cigóticos.
- Porcentaje de inducción de callo.
- Porcentaje de inducción de embriones somáticos a las: 2, 4, 8 y 12 semanas.
- Porcentaje de inducción de embriones somáticos por tratamiento.
- Porcentaje de maduración de embriones somáticos por tratamiento.
- Porcentaje de plantas regeneradas a partir de embriones somáticos por tratamiento.
- Porcentaje de adaptación de plantas en invernadero.



V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Embriogénesis somática

Etapa 1: Germinación de embriones cigóticos inmaduros

En esta investigación se logró el 90% de germinación de los embriones cigóticos hasta la sexta semana, esto se debe posiblemente a la madurez fisiológica y el manejo mecánico para su cultivo *in vitro*.

Etapa 2: Inducción de callos

A la cuarta semana de iniciado el cultivo, los extremos del explante se empezaron a necrosar, tanto en la zona radical, como en la zona apical, observándose en la parte media un color crema, a partir del cual a la quinta semana se empezó a formar callos, (Figura 4a), similares resultados fueron reportados por Shibli y Ajlouni (2000), en iris donde obtuvieron callos a la cuarta semana, utilizando la base de hoja como explante, cultivados en obscuridad; mientras que en *Gladiolus anatolicus* la formación de callo se reportó hasta la octava semana, también en obscuridad (Emek y Erdag, 2007). A la sexta semana de cultivo se observaron callos de coloración blanca cristalina en casi todo el explante, a la séptima semana se presentó un aspecto friable, de color blanco cristalino (Figura 4b). Ebrahimzadeh *et al.* (2000), reportaron callos a la octava semana de cultivo en obscuridad en *Crocus sativus*, confirmando que la aparición de callos se debe al tipo del explante, medio de cultivo, reguladores de crecimiento y a la especie estudiada.



Etapa 3: Inducción de embriones somáticos

En el presente estudio, los embriones somáticos encontrados provenían de una superficie de callos cristalinos. Los embriones somáticos obtenidos presentaron aspecto similar al estado de desarrollo de un embrión somático en etapa globular (Figura 4c). Embriones somáticos globulares fueron reportados también en especies como *Cocos nucifera*, emergiendo de callos friables cristalinos (Bidot *et al.*, 2002), a las cinco semanas de cultivo. Los embriones somáticos globulares encontrados en esta etapa, estaban cubiertas de una capa fina pegajosa y cristalina que las cubría en su totalidad, desprendiéndose con facilidad del explante madre, e incluso en el subcultivo a un medio fresco éstos llegaban a caerse, (Figura 4d).

La inducción de embriones somáticos globulares se observó a la segunda semana de cultivo (Figura 4d), similares resultados fueron reportados por Emek y Erdag (2007), encontrando estructuras embrionarias en gladiolo; Sharifi *et al.* (2010), en *Crocus sativus*; Demeter *et al.* (2010), en *Crocus heuffelianus*, provenientes también de callos cremosos y cristalinos.

A la segunda semana de evaluación, los tres tratamientos presentaron 30% de inducción de embriones somáticos globulares, mientras que para la cuarta semana, el tratamiento 1, libre de reguladores, mostró un incremento en la aparición de embriones somáticos globulares con 42%, seguido del tratamiento 2 con un leve incremento a 33%, solo que para el tratamiento tres la aparición de estructuras disminuyó considerablemente a 22% (Figura 3), siendo la concentración de BA un factor importante, ya que los callos



empezaron a necrosarse y terminaron por morir (Figura 4e). A la octava semana de inducción de embriones somáticos, ambos tratamientos disminuyeron su porcentaje, en 13% para el tratamiento 1 libre de reguladores de crecimiento vegetal, 7% para el segundo tratamiento con 3 mg L⁻¹ de BA, y 6 mg L⁻¹ de BA no se observaron embriones somáticos globulares, ya que los explantes se necrosaron totalmente y murieron (Figura 3). En la semana 12 se observó un muy bajo porcentaje de inducción de estructuras ya que solo el tratamiento 1 obtuvo un 10%, para los tratamientos 2 y 3 los explantes no respondieron.

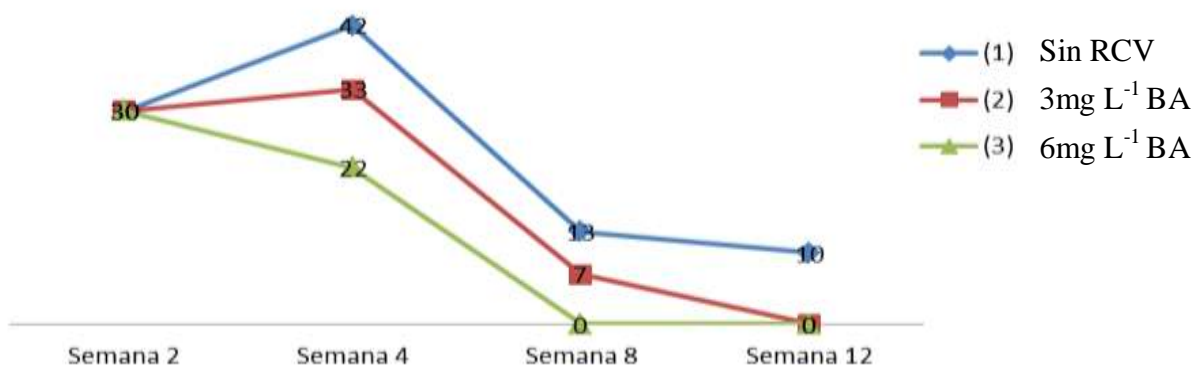


Figura 3. Inducción de ES globulares evaluados en distintos periodos de tiempo, con diferentes tratamientos (mLV 2001 Sin RCV, mLV + 3 mg L⁻¹ de BA, mLV + 6 mg L⁻¹ de BA).

Teniendo una mejor respuesta para el tratamiento 1, con 42% y tratamiento 2 de BA con 33% a la cuarta semana, en el caso del tratamiento 3 con 6 mg L⁻¹ de BA se obtuvo en mayor porcentaje a la segunda semana de cultivo con un 30%, en comparación con los días posteriores, como lo demuestra la Figura 3, ya que el exceso de RCV ocasionó a que disminuyera la inducción de embriones somáticos e incluso muriera el explante (Figura 4e).



Teniendo que la mejor inducción de embriones somáticos fue a la cuarta semana, con el tratamiento mLV al 50% sin RCV, 22% mejor que el tratamiento 2 y 50% más que el tratamiento 3, (Figura 3).

Para el caso del porcentaje total de estructuras globulares se realizó una comparación de medias donde se obtuvo que el tratamiento 1 fue en el que mayor respuesta de embriones somáticos logro con el 95% de inducción, seguido del tratamiento 2 con 77% y por último el tratamiento 3 con 53% en 6 mg L⁻¹ de BA, lo cual los datos se sumaron hasta las 12 semanas, al término de la etapa de inducción (Cuadro 4).

El tratamiento en el que se obtuvo el mayor número de embriones somáticos fue el que contenía el medio mLV al 50%, sin RCV, (Cuadro 4). En contraste, en los tratamientos con BA, los explantes se necrosaron (Figura 4e). Los resultados coinciden con los reportados por Niño *et al.* (2005), quienes también encontraron un efecto detrimental del BA en la formación de embriones somáticos, en *Crinum x powelli*.

Es importante mencionar que, aun cuando no se utilizó ningún RCV en la inducción, en la etapa anterior, los explantes estuvieron en contacto con ABA. Se ha reportado que el ABA actúa como estresante en los explantes cultivados *in vitro* (Akula *et al.*, 2000), activando la expresión de los genes responsables de la ES (Kikuchi *et al.*, 2006). Considerando lo anterior, es posible que el ABA haya favorecido la señal para la inducción de embriones somáticos en *T. pavonia*, y, aun cuando los explantes se transfirieron a medio sin reguladores, dicha inducción haya sido estimulada.

**Cuadro 4.** Respuesta a BA en la inducción de embriones somáticos. P=0.05

Tratamientos		% de ES	
(1)	Sin RCV.	95	a
(2)	3 mg L ⁻¹ BA	70	b
(3)	6 mg L ⁻¹ BA	52	b

Etapa 4: Proliferación de embriones somáticos

Al inicio de esta etapa la cantidad de ES globulares era menor, ya que no cubría en su totalidad al explante, mientras que el término de la etapa el explante estaba cubierto totalmente de ES globulares (Figura 4c). Se ha reportado en otras especies que la etapa de proliferación aumenta la tasa de producción de embriones somáticos, tal es el caso de *Crocus sativus* L. obteniendo mayor cantidad de embriones con los subcultivos (Blazquez *et al.*, 2009). En la Figura 4d, se muestra un embrión somático en estado globular, formación similar a lo reportado por Bidot *et al.* (2002), en *Cocos nucifera*. Emek y Erdag (2007), en *Gladiolus anatolicus*. Sharifi *et al.* (2010), en *Crocus sativus* y Demeter *et al.* (2010), en *Crocus heuffelianus*, de un embrión somático en estado globular, de estas especies.

Etapa 5: Maduración de embriones somáticos

Los tratamientos con ANA y BA evaluados a las seis semanas de cultivo no dieron resultados, mientras que para otras iridáceas sí han funcionado.



Los experimentos con AG₃, dieron buenos resultados ya que mostraron embriones somáticos maduros. En la Figura 4 g y 4 h, se muestra el crecimiento de los embriones somático globulares, en la zona de callos, se nota distintas fases del embrión. En la Figura 4h, se muestran los embriones somáticos, cultivados en el medio 3 mg L⁻¹ de AG₃ en luz, a la sexta semana del cultivo. Y el embrión somático maduro separado del explante madre, se muestra en la figura 4i.

Se realizó una comparación de medias para el análisis de datos, en los cuales se observa el total de ES obtenidos por explante.

El mejor tratamiento fue con 3 mg L⁻¹ de AG₃ con carbón activado en luz con 10.9 ES (Cuadro 5). Seguido del tratamiento 6 mg L⁻¹ de AG₃ con 2.7 embriones, y posteriormente el tratamiento con 3mg L⁻¹ de AG₃ con 1.8 embriones somáticos (Cuadro 5), mientras que para los tratamientos con 1.5 mg L⁻¹ de AG₃ la capacidad de maduración disminuyó. Así mismo se reportó en *Crocus heuffelianus*, una cantidad muy alta de AG₃ (25 mg L⁻¹), donde se consideró que ayuda a la regeneración de ES (Demeter *et al.*, 2010). Dato muy similar a nuestra investigación se reporta en yuca, especie totalmente distinta, en el cual se le adicionó 1 mg L⁻¹ de AG₃ (Medero *et al.*, 2000), para la maduración de embriones somáticos, utilizando yemas axilares como explante.

Comparando nuestros resultados con lo mencionado por los autores anteriores, es evidente que la cantidad de AG₃ utilizada, no siempre va a responder a una misma familia de plantas, sino al tipo de especie y al tipo de explante utilizado. Por lo tanto se



sugiere que el AG_3 $mg L^{-1}$ ayuda a la elongación celular de los embriones somáticos ayudándolos a su desarrollo, como se pudo observar en la maduración de los ES de esta investigación.

Cuadro 5. Respuesta a, AG_3 y a condiciones luz y oscuridad en la maduración de embriones somáticos. $P=0.05$

Tratamientos		Embriones madurados	
AG_3 ($mg L^{-1}$)	Condición		
1.5	oscuridad	0.3	d
1.5	luz	0.6	d
3	oscuridad	1.8	c
3	luz	10.9	a
6	oscuridad	0.5	d
6	Luz	2.7	b

Así mismo en las dos condiciones de cultivo (luz y oscuridad), existió una gran diferencia entre tratamientos, aunque tengan la misma cantidad de RCV. Tal es el caso del tratamiento con $3 mg L^{-1}$ de AG_3 , donde se obtuvo 10.9 ES en luz mientras que en oscuridad se obtuvieron 1.8 ES observado la diferencia significativa que hay entre ambos. Mientras que con $6 mg L^{-1}$ de AG_3 , en luz se obtuvieron 2.7 embriones, para el tratamiento en oscuridad se obtuvieron 0.5 ES, en ambos tratamientos existe una diferencia significativa. Para el de AG_3 con $1.5 mg L^{-1}$ no se encontró diferencia entre ambos tratamientos (Cuadro 5). Sugiriendo que en condiciones de luz, los embriones somáticos responden mejor a la maduración. Según lo reportado por Leszek (2003), AG_3 se sintetiza mejor en luz que en oscuridad.



Etapa 6: Germinación de embriones somáticos

Se obtuvo un 100% de germinación de embriones somáticos, (Figura 4k). La germinación de los embriones inicio con el desarrollo de la parte apical y posteriormente la parte radical (figura 4j), aproximadamente a las seis semanas de ser transferidos al nuevo medio, por lo tanto se obtienen 10.9 plántulas *in vitro* por explante.

La germinación del embrión somático, fue similar a la germinación de un EC, según lo reportado por Piña-Escutia *et al.* (2010a). Donde también se pudo observar la similitud fue en la etapa de germinación de EC de esta investigación.

Comparado nuestros resultados con la propagación descrita por Vázquez *et al.* (2001), en forma natural, donde reporta que una semilla puede germinar y dar una sola planta en un año, mientras que de un bulbo se obtienen cuatro bulbos en dos años, y Piña-Escutia *et al.* (2010a), reportaron que de un explante se obtienen cuatro plantas en cinco meses, por la vía de embriogénesis somática se aumentó la reproducción de *Tigridia pavonia*.

5.2 Adaptación de *in vitro* plantas

La adaptación de plantas se realizó transfiriendo las plantas obtenidas a partir de embriones somáticos, a macetas con la mezcla descrita en materiales y métodos. Se obtuvo un 100% de adaptación de las plantas obtenidas por embriogénesis somática, por este mecanismo se obtuvieron 10.9 plantas de *Tigridia pavonia* en 39 semanas partiendo del eje hipocótilo radicular, como explante.

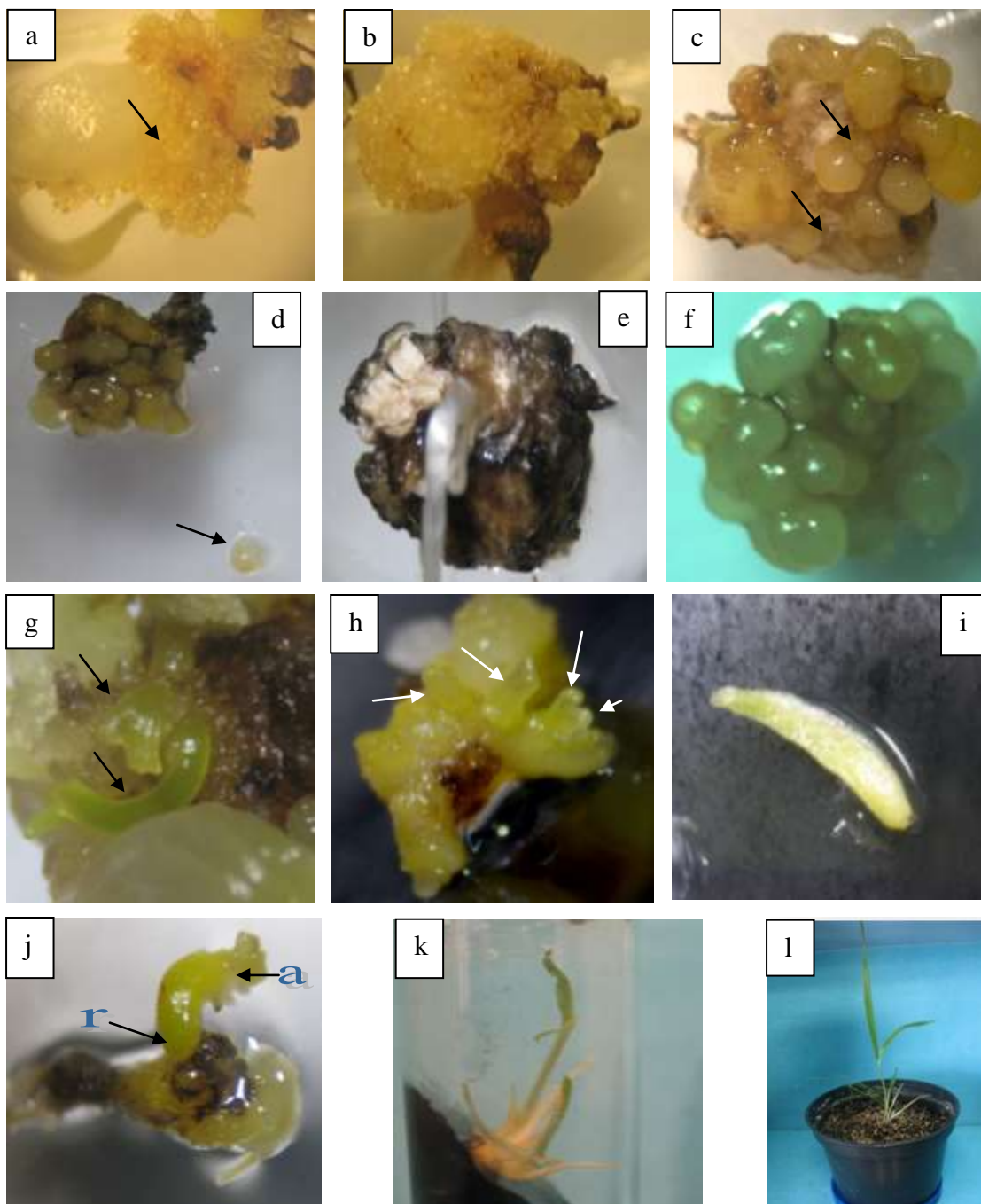


Figura 4. Etapas en la obtención de embriones somáticos: **a** inducción de callos (flecha), a la quinta semana de cultivo en el medio mL_V al 50%, **b** callos friable de color cristalino, **c** inducción de ES globulares (flechas) a la cuarta semana en el medio de cultivo mL_V, sin RCV, **d** ES en etapa globular separado del explante madre con 45 días de desarrollo aproximadamente, **e** explante necrosado, con 6 mg L⁻¹ de BA, que no prosperó. **f** proliferación ES globulares, a las doce semanas de cultivo. **g** ES, maduros (flecha) con 3mg L⁻¹ de AG₃ a las seis semanas de cultivo. **h** ES de distintas etapas, señalados por las flechas. **i** ES maduro, separado del explante madre, explante utilizado para el análisis histológico. **j** germinación del embrión somático a las tres semanas de cultivo. **k** plántula enraizada a las siete semanas. **l** planta obtenida por ES, adaptada a invernadero a las tres semanas de adaptación. a-apical, r-radical.



5.3 Análisis histológico

(a) Microscopia de luz: En la Figura 5a se observa el embrión somático en estado globular obtenido en un medio de inducción libre de RCV a las cuatro semanas de cultivo, con un desarrollo similar a un embrión cigótico a los 36-38 días después de la antesis, según lo reportado por Carrillo y Egleman (2002), en la anatomía de la semilla de *Tigridia pavonia*. En la Figura 5b, se muestra el corte histológico de la Figura 5a, observando, que el procambium está en proceso de formación, en la parte central del embrión (Esau, 1976; Lara *et al.*, 2003).

Figura 5c se muestra la formación de múltiples embriones somáticos en distintas fases de su desarrollo. Figura 5d, corte histológico longitudinal a los 60 días de desarrollo donde se observa el procambium en el centro del embrión somático, donde se muestra que el procambium no tienen ninguna conexión con el tejido madre, observando el suspensor en la parte inferior del ES. Figura 5e, embrión somático a los 80 días de desarrollo, donde ya se diferencia procambium, del cual sigue sin observarse la conexión entre el ES y el explante madre, corroborando la presencia de embriones somáticos. Estos resultados coinciden con lo reportado por Lara *et al.* (2003), donde mencionan que un embrión somático no comparte el procambium con el del explante madre, mientras que un brote si lo comparte. Esto demuestra el origen celular de los embriones somáticos obtenidos.

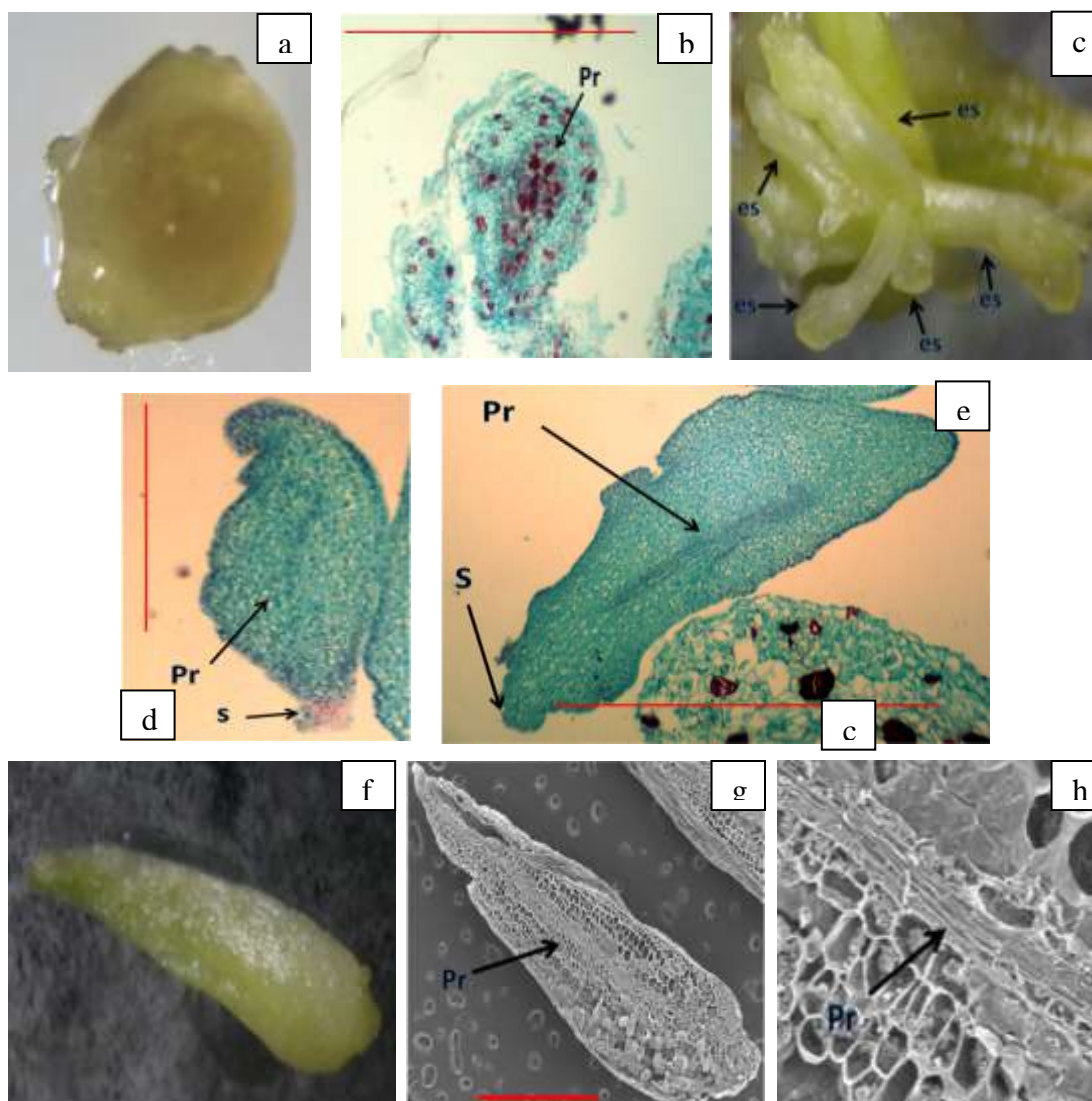


Figura 5. Histología de un embrión somático de *Tigridia pavonia*. **a**, ES en estado globular separado del explante madre. **b**, Corte longitudinal del ES en estado globular; observación por microscopia de luz, observándose el inicio del procambium, 40x **c**, utilizados para el análisis histológico. **d**, ES en etapa globular a torpedo, corte longitudinal, por microscopia de luz, se nota ya la formación del procambium, no se nota conexión con el explante madre, 40x. **e**, ES en estado de torpedo corte histológico y microscopia de luz, estructura en corte longitudinal, mostrando el procambium ya establecido, 10 x. **f**, ES separado del explante madre, a los 126 días de desarrollo, 10 x. **g**, corte longitudinal del ES, donde se observa el tejido vascular. **h**, acercamiento para diferenciar el tejido vascular. 80 x. barra = 1 mm. Pr= procambium, S= suspensor, es= embrión somático.



(b) Microscopio electrónico de barrido: los análisis realizados por esta técnica fueron con embriones en un desarrollo completo, a los 126 días de crecimiento. Figura 5f, se observa el embrión somático en un medio con MS (1962), adicionado con 1 g L^{-1} de carbón activado, observado en un microscopio estereoscópico, mientras que en la Figura 5g se observa el corte longitudinal del mismo embrión somático a 10x, visualizado en un microscopio electrónico de barrido.

Datos similares se reportan en *Crocus heuffelianus* por Demeter *et al.* (2010), encontrando una estructura similar con el procambium en formación. Así mismo en *Crocus sativus*, Sharifi *et al.* (2010), mostrando el inicio de los tejidos vasculares, para esta especie, donde al observar la Figura 5h, se visualiza ya el inicio de tejidos vasculares, según lo reportado por Lara *et al.* (2003) y Paredes (2010), en este estado de desarrollo el tejido vascular se encuentra diferenciado.



VI. CONCLUSIONES

Se obtuvo un 90% de germinación de embriones cigóticos.

Se logró la inducción de callo en el eje hipocotilo radicular.

La inducción de embriones somáticos se logró en un 42% a la cuarta semana, en el medio mL_V al 50% sin reguladores de crecimiento vegetal.

El mejor tratamiento para maduración de los embriones somáticos fue con 3mg L⁻¹ de AG₃, en condiciones de luz.

La germinación de embriones somáticos fue del 100%.

Se logró el 100% de la adaptación de plantas regeneradas a invernadero, logrando 10.9 plantas por explante, en un periodo de 9 meses con 3 semanas

Se regeneraron 10.9 plantas por explante en un periodo de 39 semanas, vía embriogénesis somática.

El análisis histológico permitió corroborar el origen celular de embriones somáticos



VII. BIBLIOGRAFÍA

- ♣ Alonso G M, 2002. Biotecnología aplicada a mejora de *Pelargonium*. Facultad de CC. Biológicas. Tesis de doctorado, Universidad Complutense de Madrid: 22-35 pp.
- ♣ Al-Gabbiesh A S, Dhia H, Afiti F, 2006. *In vitro* propagation of endangered *Iris* species. Journal of Biological Sciences 6(6): 1035-1040
- ♣ Arzate-Fernandez A M, Piña-Escutia J L, Zavaleta-Mancera A, 2008. Inducción de proembriones somáticos en ave del paraíso (*Strelitzia regiae* Banks). Fitotecnia Mexicana 31(2): 183-186.
- ♣ Akula A, Akula C, Bateson M, 2000. Betaine a novel candidate for rapid induction of somatic embryogenesis in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). Plant Growth Regulation 30: 241–246.
- ♣ Bidot I, Manuel de F, Capote A, Chávez M, Quiala E, Barbón R, Naivy P y Juan C P, 2002. Formación de callos y embriones somáticos de *Cocos nucifera* L. cv. Indio Amarillo en medio de cultivo semisólido. Biotecnología Vegetal 3: 137-141.



- ♣ Blazquez S, Olmos E, Hernandez J A, Fernandez G N, Fernandez J A, Piqueras A. 2009. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 97:49–57.

- ♣ Carneros G E, 2009. Embriogénesis somática en pino piñonero (*Pinus pinea* L.). Tesis doctoral, Universidad de Halcalá de Henares. Madrid.

- ♣ Carrillo O A, Engleman C E M, 2002. Anatomía de la semilla de *Tigridia pavonia* (Iridaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 67-77.

- ♣ Celestino C, Hernández I, Carneros E, López-Vela D y Toribio M, 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal, Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA) 14(3): 345-357.

- ♣ Demeter Z, Suranyi G, Attila M V, Sramko G, Beyer D, Kónya Z, Vasas G, Hamvas M M, Máth C, 2010. Somatic embryogenesis and regeneration from shoot primordia of *Crocus heuffelianus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 100:349–353.



- ♣ Ebrahimzadeh H, Karamian R, and Noori-Dalooi M R, 2000. Somatic Embryogenesis and regeneration of plantlet in saffron, *Crocus sativus* L. *J. Sci. I. R. Iran.* 11(3): 169-173.
- ♣ Emek Y and Erdag B, 2007. Somatic embryogenesis from leaf explants *Gladiolus anatolicus* (Moiss.) Stapf. *Pakistan journal of Biological Sciences* 10 (8): 1190-1194.
- ♣ Esau K, 1976. *Anatomia vegetal.* Omega S.A.
- ♣ Fuentes S R L, Calheiros M B P, J Manetti-Filho 2000. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60: 5-13.
- ♣ Glendon D A, John E E, Johannes V S, 2009. Micropropagation of iridaceae- a review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 97: 1-19.
- ♣ Kamada H, Tachikawa Y, Saitou T, Harada H, 1994. Heat stress induction of carrot somatic embryogenesis. *Plant tissue culture letters*, 11(3): 229-132.
- ♣ Kikuchi A, Sanuki N, Higashi K, Koshiha T, Kamada H, 2006. Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta* 223: 637-645.



- ♣ Klimaszemskak, Park Y – S, Overrton C, Mac E I, Bonga J M, 2001. Optimized somatic embryogenesis in *pinus strobes* L. *In vitro* Cell. Dev Biol. Plant 37: 392-399.

- ♣ Lara A, Valverde R, Gomez L, 2003. Histología de embriones somáticos y brotes adventicios inducidos en hojas de *Psichotria acuminata*. *Agronomia costarricense* 27(1): 37-48.

- ♣ Leszczyńska-Borys H, Borys M W, Borys M T, 1995. Algunas características de la *Tigridia pavonia* Ker. Gawl. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*. 4: 117-130.

- ♣ Leszek S J, 2003. Reguladores de crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Volumen 1, propiedades y acción. Universidad Autónoma Chapingo. 67-92

- ♣ Lincy K A, Remasher B A, Sasikumar B, 2009. Indirect and direct somatic from aerial stem explants of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Acta Bot. Croat.* 68 (1): 93-109.

- ♣ Malik M 2008. Comparison of different liquid/solid culture systems in the production of somatic embryos from *Narcissus* L. ovary explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94:337–345.



- ♣ Medero R V, Borroto N C, Rodríguez M S, Gómez K R, López T J, García G M, J de la C V, Espinosa L del S, Manuel C J, Martínez M, Marlenys T, Yadenys T, Alvarez M y J García, 2000. Embriogénesis somática a partir de meristemas axilares en yuca. *Biotecnología Vegetal*, 1: 21-26.

- ♣ Mejía F R, 2003. Embriogénesis somática y regeneración de plantas de agave mezcalero (*Agave angustifolia*). Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad autónoma del Estado de México.

- ♣ Molseed E 1970. The genus *Tigridia* (*Iridaceae*) of Mexico and Central America. University of California. Publications in Botany. Berkeley. 54: 1-126.

- ♣ Murashige T and Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco cultures. *Physiological Plant* 15: 473-497.

- ♣ Niño O J, Milena C N Y, Marino M M O, Adrina R Q L, 2005. Cuantificación de licorina en callos y raíces cultivados *in vitro* de *crinum x powelli* “álbum2 (Amarillidaceae) por cromatografía de líquida de alta eficiencia (HPLC). *Scientia el Technica*. 29: 83-88



- ♣ Park Y S, Lelu-Walter M A, Harvengt L, Trontin J F, MacEacheron I, Klimaszewska K, Bonga J M, 2006. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobes*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris*, at three laboratories in Canada and France. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86:87-101.

- ♣ Paredez F W, 2010. Tejidos vegetales. Institución Educativa Internacional.

- ♣ Paz-Ramírez A 2000. Tesis de Licenciatura; Inducción de embriogénesis somática *in vitro* de *Coffea arabica* a partir de explantes foliares, Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. p.3-7.

- ♣ Pierik R L M 1988. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores, 3rd edn. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. p. 326.

- ♣ Piña-Escutia J L, Vazquez-Garcia L M, Arzate-Fernandez A M, 2010a. *In vitro* regeneration and genetic fidelity of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. *Journal of Biotechnology*, 13 (1)

- ♣ Piña-Escutia J L, Vazquez-Garcia L M, Arzate-Fernandez A M, 2010b. Variety discrimination of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. Assesed by different length RAPD primers. *Journal of Biotechnology* 13 (4).



- ♣ Sharifi G, Ebrahimzadeh H, Ghareyazie B, Karimi M, 2010. Globular embryo-like structures and highly efficient thidiazuron-induced multiple shoot formation in saffron (*Crocus sativus* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 46:274–280.

- ♣ Shibli R A y Ajlouni M M, 2000. Somatic embryogenesis in endemic black iris. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 61:15-21.

- ♣ Shimizu K, Nagaike H, Adachi T, 1997. Plant regeneration from suspension culture of *Iris germanica* L. *Tissue and Organ Culture* 50: 27-31

- ♣ Vázquez-García, L M, Norman M T H, Corona R M C, 2001. Oceloxòchitl *Tigridia pavonia* (L.f) DC. Colección: Ciencias Naturales y Exactas. Serie: Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. p. 69.

- ♣ Vázquez-García L M, Arzate-Fernandez A M, Mungia-Lino G, Piña-Escutia, J L, Leszczyńska-Borys H, M W Borys, Larrucea A, Meza-Aguilar C, 2010. Fenología de especies de *Tigridia*, SINAREFI. Universidad Autónoma del Estado de México. p. 21.

- ♣ Vílchez P J A, Albany V N R, Gómez-Kosky R, García L 2002. Inducción de embriogénesis somática en *Psidium guajava* L. a partir de embriones cigóticos. *Revista Facultad de Agronomía Cuba* 19: 284-293



- ♣ Zavattieri A M, Frederico M A, Lima M, Sabino R, Arnholdt-Schmitt B, 2010. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journals of Biotechnology* 13(1):1-9.