



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

CULTIVO IN VITRO DE *STRELITZIA REGINAE*

A PARTIR DE SECCIONES DE OVARIOS

ESPECIALIDAD EN FLORICULTURA

PRESENTA:

MAYRA PAULINA FLORES ALCÁNTARA

PROYECTO FINAL

ASESOR:

DR. JOSÉ LUIS PIÑA ESCUTIA

JUNIO, 2018

CAMPUS UNIVERSITARIO "EL CERRILLO", PIEDRAS
BLANCAS, TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO.



LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamiento para la desinfestación para las flores de *Strelitzia reginae*.

Cuadro 2. Tratamientos para inducción de callo a partir de secciones de ovario de *Strelitzia reginae*.

Cuadro 4. Tratamientos de expresión a partir de ovario de *Strelitzia reginae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Secciones de ovario de *Strelitzia reginae* en diferentes etapas del cultivo a) Escala de clasificación de oxidación b) Tratamiento dos, a 7 días de establecido el cultivo, c) Tratamiento tres, a 14 días de establecido el cultivo, d) Tratamiento 18, a 21 días de establecido el cultivo, d) Tratamiento 15 y e) Tratamiento 9, pardeamiento en la superficie del explante la cuarta semana de iniciado el cultivo.

Figura 2. Promedio semanal del grado de oxidación de los 20 tratamientos de acuerdo a la escala modificada por Ziv y Halevy (1983): 1 = Nula oxidación, 2 = oxidación parcial, 3= Oxidación total y 4 = Pardeamiento oxidativo.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue lograr la embriogénesis, determinar la concentración de reguladores de crecimiento es la más adecuada para formar embriones, así como regular la oxidación de los explantes y brotes causados por la oxidación fenólica representativa de *Strelitzia reginae*. Los resultados mostraron que los cortes hechos a los ovarios afectaron significativamente la oxidación y evitaron la formación de embriones. Los tratamientos con diferentes concentraciones de 2, 4, D, así como la adición de antioxidantes en el medio y en el pretratamiento hecho a los explantes no fueron importantes a la hora de evitar por completo la oxidación, pero sí lograron que los explantes se mantuvieran libre de pardeamiento al menos un mes a comparación del testigo, ausente de reguladores vegetales y antioxidantes.

ABSTRACT

The objective of this study was embryogenesis, determining the concentration of growth regulators is the most appropriate to form embryos, as well as regulating the oxidation of the explants and shoots caused by phenolic oxidation representative of *Strelitzia reginae*. The results showed that cuts made to the ovaries significantly affected oxidation and prevented the formation of embryos. The treatments with different concentrations of 2, 4, D, as well as the addition of antioxidants in the medium and in the pretreatment made to the explants were not important at the time of completely avoiding oxidation, but they did manage to keep the explants free of browning at least one month compared to the control, absent of plant regulators and antioxidants.

INDICE

	Página
LISTA DE CUADROS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivo general.....	2
1.2. Objetivos Específicos.....	2
1.3. Hipótesis.....	2
1.4 Justificación.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Género <i>Strelitzia reginae</i>	3
2.1.1. Origen y distribución.....	3
2.1.2. Descripción morfológica.....	4
2.1.3. Usos.....	5
2.1.4. Propagación.....	6
2.1.4.1. Sexual	6
2.1.4.2. Asexual.....	7
2.2. Propagación <i>in vitro</i>	7
2.2.1. Reguladores de crecimiento vegetal (RCV).....	9
2.2.2. Antioxidantes.....	10

2.2.3. Propagación <i>in vitro</i> de <i>Strelitzia reginae</i>	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. Ubicación del experimento.....	15
3.2. Obtención del material vegetal.....	16
3.3. Desinfestación de flores.....	16
3.4. Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de las secciones de ovario.....	16
3.5. Expresión de la embriogénesis	18
3.6. Análisis estadístico.....	19
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1. Embriogenesis.....	19
4.2. Oxidación fenólica.....	22
4.3. Análisis estadístico.....	24
V. CONCLUSIONES.....	25
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	25

INTRODUCCIÓN

Strelitzia reginae, o ave de paraíso, es nativa de Sudáfrica, pertenece a la familia *Strelitziaceae*, se conocen 7 especies cultivadas como plantas ornamentales (según Exótica), que son: *S. augusta*, *S. caudata*, *S. nicolai*, *S. parvi folia*, *S. parvi folia juficeu* y *S. reginae*. Esta última es altamente estimada y ampliamente cultivada como ornamental. La importancia económica del cultivo radica en las diferentes utilidades que se le da a esta flor, que van desde su uso principal como flor cortada; las flores individuales duran aproximadamente una semana, pero una sola bráctea en forma de barco producirá varias flores en sucesión, hasta su cultivo en macetas, utilización de sus hojas glaucas grandes que se asemejan a las de plantas del plátano, en jardinería es ampliamente utilizado en paisajismo como una planta arquitectónica y punto focal. Se propaga generalmente de manera asexual, se hace manualmente separando los hijuelos de las matas, por esta razón su explotación comercial y su éxito están limitados por su tasa baja de multiplicación. El cultivo de tejidos vegetales es la ciencia de crecimiento de células vegetales, tejidos u órganos aislados de la planta madre, en medios artificiales. El cultivo *in vitro* de ave de paraíso no ha sido del todo exitosa ya que los explantes generan fenoles causantes del oscurecimiento de los tejidos. Existen algunos agentes antioxidantes para el control de la fenolización para el cultivo *in vitro*; los antioxidantes más usados son el ácido ascórbico (AA), ácido cítrico, L-cisteína, cisteína hidrociorada, carbón activado (CA), polivinilpirrolidona (PVP) y tiosulfato de sodio. Estos compuestos se pueden usar antes del establecimiento del material o adicionándolos al medio de cultivo (George, 1996; Jiménez, 1998; Reyes-Padilla, 2001). Los trabajos realizados han utilizado como explantes a embriones, yemas axilares, segmentos foliares, raíces entre otros. La adición de ácido naftalenacético (NAA) y bencil-aminopurina (BAP) ha generado callos (North *et al.*, 2012), se han registrado la formación de brotes suplementando BAP (Karnataka

J., 2008) o en presencia de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) formaron proembriones somáticos, aun cuando los explantes se hubieran oscurecido, (Arzate *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos a partir de estos estudios no han dado resultados favorables para la propagación de esta especie, por ello es interesante generar este estudio para contribuir a su rápida multiplicación evitando la oxidación de los explantes.

OBJETIVO GENERAL

Formar embriones directa o indirectamente a partir de secciones de ovario y de *Strelitzia reginae*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar que concentración de reguladores de crecimiento es la más adecuada para formar embriones.
- Regular la oxidación de los explantes y brotes.

JUSTIFICACIÓN

Strelitzia reginae, es una especie de importancia comercial a nivel estatal, nacional e internacional.

HIPÓTESIS

El ovario de *Strelitzia reginae*, es un tejido que contiene meristemas en la placenta los cuales pueden formar embriones somáticos directos.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Strelitzia reginae*

2.1.1. Origen y distribución

Strelitzia reginae, o ave de paraíso, es nativa de Sudáfrica. Primero fue introducida en Gran Bretaña en 1773 por el sir José Banks, entonces el director no oficial de los jardines reales en Kew (como eran sabidos en ese tiempo). Nombró a la exquisita planta *Strelitzia* en honor a la reina Charlotte, esposa de George III y duquesa de Mecklenburg-Strelitz, que vivió en Kew durante muchos años. Se ha introducido en partes de la América central y tropical del sur y se cultiva extensamente como ornamental. (<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:798194-1>).

Esta familia presenta 3 géneros con distribución, en regiones tropicales, característica: *Ravenala* habita en Madagascar, *Phenakospermum* habita en el N América del Sur y *Strelitzia* de Sudáfrica; los 3 géneros de la familia son cultivados por su valor ornamental, ya sea en su lugar de origen, en zonas de climas afines o en invernaderos de otras regiones (Guía de Consultas Diversidad Vegetal. FACENA (UNNE). MONOCOTILEDONEAS – Zingiberales: Strelitziaceae; Anderson, 1998; Heywood, 1985).

Se conocen 7 especies de strelitzias cultivadas como plantas ornamentales, que son: *S. augusta*, *S. caudata*, *S. nicolai*, *S. parvifolia*, *S. parvifolia juficeu* y *S. reginae*. Pero solamente de esta última (*S. reginae*) se ha extendido su cultivo como flor cortada, teniendo verdadero interés comercial. Por este motivo, en lo sucesivo nos referiremos exclusivamente a ella.

La superficie sembrada del cultivo de ave de paraíso es de 106.50 has., en el estado de México los principales productores son: Valle de Bravo, Villa Guerrero, Coatepec Harinas, Donato

Guerra, Malinalco, Tenancingo, Ixtapan del Oro y Tonicato, donde se producen 38,951 gruesas, (SEDAGRO, 2014).

2.1.2 Descripción morfológica

Odriozola y Albertos en 1972 describieron botánicamente a *Strelitzia reginae* como una planta herbácea, perenne y vivaz que pertenece a la familia de las Musáceas, por lo que se puede decir que es pariente muy cercano de la platanera.

Raíz: fasciculadas, en corto número, son gruesas y carnosas, y profundizan y se extienden mucho en el terreno; en las principales se acumulan gran cantidad de sustancias de reserva.

Tallo: acaule, es decir, carece de tallo.

Porte: herbáceas, algunas leñosas, en estas últimas los tallos están formados por las bases envainadoras.

Hojas: Persistentes, simples, alternas, dísticas, pinnatinervadas, de color verde glauco, coriáceas, con los bordes algo ondulados, pruinosas, con peciolo muy largo, envainadoras y el ápice generalmente cóncavo. Su forma y dimensión varían mucho según individuos y plantaciones, pudiendo ser ovales, lanceoladas, elípticas, etc.

Las flores se presentan reunidas en inflorescencias, las cuales se asientan en el remate de los escapos o tallos sin hojas que nacen del cuello de la planta, siendo protegidos en su base y tercio inferior por los peciolos de las hojas que los abrazan. El escapo mide de 0.40 a 1.70 metros.

Inflorescencia: protegida por una espata carnosa de forma de barquilla, en cuyo interior están las flores que se van abriendo paulatinamente.

Corola de color azul, formada por tres pétalos, soldados en una pieza en forma de alabarda, que se abre por su parte superior dejando ver en su interior los estambres y el estilo

Ovario ínfero, es decir, que ocupa una porción inferior con respecto a la «flor», de forma alargada, de sección triangular, con tres cavidades y con 70 a 90 óvulos.

Cáliz constituido por dos sépalos, lanceolados, petaloideos, de color amarillo-naranja más o menos intenso. Tamaño de 10-13 centímetros.

Cinco estambres filiformes, de unos 2 centímetros de largo, con anteras lineales de 5 centímetros de largo, adheridas al extremo de la alabarda de la corola.

Un solo estilo filiforme, de 8-10 centímetros de largo, incrustado en la alabarda y terminado en un largo estigma más grueso que el estilo y muy viscoso.

Fruto: es una cápsula dehiscente, trilocular, es decir, con tres cavidades, que contiene la semilla con número variable, pero que suelen ser de 70 a 80.

Semillas: de forma esférica o ligeramente globales, tienen un diámetro de 6-8-10 mm, y pesan de 0,15 a 0,25 gramos cada unidad, por lo que un gramo contiene de cuatro a seis semillas. En la parte opuesta a donde nacerá la radícula, la semilla tiene una cabellera anaranjada que debe quedar siempre hacia el cielo en el momento de la plantación.

Esta planta tiene tendencia al polimorfismo, sobre todo en cuanto a la altura, forma y dimensión de las hojas, largo del tallo floral, tamaño de la flor, etc.; de tal forma que podemos decir que cada individuo reproducido por semilla presenta sus propias características.

2.1.3. Usos

Strelitzia reginae es altamente estimada y ampliamente cultivada como ornamental. La importancia económica del cultivo radica en las diferentes utilidades que se le da a esta flor, que van desde su uso principal como flor cortada; las flores individuales duran aproximadamente una semana, pero una sola bráctea en forma de barco producirá varias flores en sucesión, hasta su cultivo en macetas, utilización de sus hojas glaucas grandes que

se asemejan a las de plantas del plátano, en jardinería es ampliamente utilizado en paisajismo como una planta arquitectónica y punto focal o bien la producción de semillas.

2.1.4. Propagación

2.1.4.1 Sexual

La polinización manual es necesaria para producir semillas, pero esto raramente funciona. Para la etapa de germinación y crecimiento inicial, las semillas necesitan calor de fondo de por lo menos 21 ° C. Algunas nuevas poblaciones de plantas sembradas pueden alcanzar el tamaño de floración en dos o tres años, pero los especímenes individuales pueden tomar hasta diez años. Debido a la dificultad de producir las semillas, *Strelitzia reginae* se propaga generalmente dividiendo las plantas o usando las ventosas producidas en la base. Las plantas maduras no deben ser divididas con demasiada frecuencia, ya que las raíces carnudas pueden ser fácilmente dañadas por la perturbación, (<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:798194-1>).

En su estado natural se encuentra en riberas y claros en zonas costeras (Guía de Consultas Diversidad Vegetal. FACENA (UNNE). Monocotiledoneas – Zingiberales: *Strelitziaceae*); por lo tanto *Strelitzia reginae* es una planta que resiste temperaturas de +5°, es bien conocido el efecto del calor sobre la floración. Su temperatura óptima de cultivo parece estar comprendida entre los 15° y 30° C. Una gran importancia tiene también la luz, de tal forma que algunas plantas que no llegan a recibir suficiente cantidad de luz se quedan sin florecer (plantas nulas) (Odriozola y Albertos, 1972).

2.1.4.2. Asexual

La multiplicación asexual de *Strelitzia reginae* se realiza por división de hijuelo, se hace manualmente separando los hijuelos de las matas, teniendo la precaución de hacerlo solo de

las matas más floríferas para optimizar las sucesivas producciones, (<https://www.floresyplantas.net/strelitzia-reginae/>).

La propagación por división de rizomas, es un método bastante caro pues los rizomas o parte de éstos, (macollas) ya que los adultos adquieren un alto valor en el mercado y a veces son difíciles de conseguir, pero tiene la ventaja de que la plantación entra pronto en producción (2 a 3 años), y además las plantas son más uniformes y floríferas, en el caso de que la selección de las plantas a reproducir se haya hecho correctamente. Sin embargo, este método se ha ido extendiendo de tal forma que hoy es el más común y prácticamente el único usado por los cultivadores que se inician en este cultivo (<http://fausac.usac.edu.gt/tesario/tesis/T-02097.pdf>).

El ave del paraíso es una planta de valor comercial significativo; sin embargo, su explotación comercial y su éxito están limitados por su tasa naturalmente baja de multiplicación (Ziv. Halevy, 1983, George *et al.*, 2008).

2.2. Propagación *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales es la ciencia de crecimiento de células vegetales, tejidos u órganos aislados de la planta madre, en medios artificiales. El cultivo de órganos se utiliza como un término general para los tipos de cultivo en la que una forma organizada de crecimiento puede mantenerse continuamente. Incluye el aislamiento aséptico de plantas enteras de estructuras tan definidas como primordios de hojas, flores y frutos inmaduros, y su crecimiento *in vitro*. Para los propósitos de la propagación de las plantas, los tipos más importantes de cultura de órganos son:

- Cultivos de meristemas, en los cuales se cultivan pequeños ápices, cada uno de los cuales consiste en la cúpula meristémica apical con o sin uno o dos primordios foliares. El ápice del brote se cultiva típicamente para dar un solo rodaje.

- La punta del brote, o cultivos de brotes, comenzaron a partir de puntas de brotes escindidas, o brotes, mayores que los ápices de brotes utilizados para establecer cultivos de meristemas, con varios primordios foliares. Estos ápices de los brotes se cultivan generalmente de tal manera que cada uno produce múltiples brotes.

- Cultivos nodales de brotes laterales separados, cada uno llevado en un pedazo pequeño del tejido del vástago; Se pueden cultivar piezas de vástago que llevan nodos únicos o múltiples. Cada brote se cultiva para proporcionar un solo brote.

- Cultivos de raíz aislados. El crecimiento de las raíces, desconectado de los brotes: se puede obtener un sistema radicular ramificado

- Cultivos de embriones, donde los embriones zigóticos (semillas) fertilizados o no fertilizados se diseccionan de semillas o frutos en desarrollo y se cultivan *in vitro* hasta que se han convertido en plántulas. El cultivo de embriones es muy distinto de la embriogénesis somática, (George *et al.*, 2008).

Las plantas obtenidas del cultivo de tejidos pueden derivarse de diversas maneras:

- De brotes preexistentes o brotes primordiales (meristemas) que se animan a crecer y proliferar;

- Después de la morfogénesis del brote, cuando se induce la formación de nuevos brotes en tejidos no organizados o directamente sobre tejidos extraídos de la planta madre;

- Mediante la formación de embriones somáticos que se asemejan a los embriones de semillas de plantas intactas, y que pueden crecer en plántulas de la misma manera (embriogénesis somática).

La totipotencia, es una característica especial de las células de los tejidos jóvenes y los meristemas, es la generación de nuevas plantas a partir de células. Los cultivos de tejidos se inician a partir de piezas de plantas enteras. Los pequeños órganos o trozos de tejido que se

usan se llaman explantes. La parte de la planta (planta madre o planta madre) a partir de la cual se obtienen los explantes depende del tipo de cultivo que debe iniciarse; el propósito de la cultura propuesta y/o las especies vegetales que se van a utilizar. (George *et al.*, 2008).

Por ejemplo el ovario contiene uno o más óvulos, cada óvulo está unido a la pared del ovario en una placenta. La disposición de las placentas y el número de carpelos y lóbulos de ovario varían en diferentes especies. En muchas especies sincarpóreas, el número de lóculos y carpelos de ovario es equivalente, pero esto puede variar; por ejemplo, en la mayoría de las orquídeas, el ovario es sincarpo, tricarpelar y unilocular. Los óvulos nacen de las placentas, que son regiones meristemáticas que se encuentran en los márgenes de los carpelos dentro de los lóculos del ovario¹⁰⁰ (George *et al.*, 2008).

La disposición de las placentas (placentación) varía entre las especies. En las especies con dos o más lóculos en los que los óvulos nacen de placentas en el eje central, la placentación es axil. La placentación parietal se produce en algunas especies con ovarios uniloculares, aunque se observan septos falsos en algunas especies. Otros tipos de placentación ocurren en ovarios uniloculares; por ejemplo, las placentas pueden estar en la base del ovario (placentación basal) o en la parte superior de la columna central de tejido que no está unida a la pared del ovario, excepto en la parte superior e inferior (placentación central libre).

Debido a que se inician a partir de pequeños explantes y se deben cultivar en medios nutritivos que también son favorables para el crecimiento de microorganismos, los cultivos de tejidos de plantas se deben establecer y mantener generalmente en condiciones asépticas (George *et al.*, 2008).

2.2.1. Reguladores de crecimiento vegetal

Algunos productos químicos que ocurren naturalmente dentro de los tejidos vegetales (es decir, endógenos), tienen un papel regulador, más que nutricional, en el crecimiento y

desarrollo. Estos compuestos, que son generalmente activos a concentraciones muy bajas, se conocen como hormonas vegetales (o sustancias de crecimiento de plantas). Los productos químicos sintéticos con actividades fisiológicas similares a las sustancias de crecimiento de las plantas, o compuestos que tienen la capacidad de modificar el crecimiento de las plantas por otros medios, por ejemplo poliaminas, se denominan habitualmente reguladores del crecimiento de las plantas. Algunas de las sustancias naturales de crecimiento se preparan sintéticamente a través de procesos de fermentación y se pueden adquirir de productos químicos. Cuando se han añadido estos productos químicos a los medios de cultivo de tejidos vegetales, se denominan reguladores de crecimiento de planta, (George *et al.*, 2008).

Existen varias clases reconocidas de sustancia de crecimiento vegetal.

- Auxinas
- Citoquininas
- Giberelinas
- Etileno
- Ácido abscísico

2.2.2 Antioxidantes

Un antioxidante se define como un donador de electrones que inhibe la oxidación de sustratos, estos remueven el oxígeno de otras moléculas a través de los agentes reductores que contienen o por otros componentes que actúan por mecanismos alternos como atrapando o desactivando los iones libres. Esos agentes disminuyen el potencial de reducción/oxidación (Redox) y son eficientes en evitar el oscurecimiento del tejido y la oxidación de los fenoles libres (George, 1996). Los antioxidantes más usados son el ácido ascórbico, ácido cítrico, L-cisteína, cisteína hidrociorada, carbón activado, polivinylpirrolidona (PVP) y tiosulfato de

sodio. Estos compuestos se pueden usar antes del establecimiento del material o adicionándolos al medio de cultivo (George, 1996; Jiménez, 1998; Reyes-Padilla, 2001).

La oxidación se da por un incremento de la biosíntesis de enzimas y la oxidación de fenoles involucradas en dicho proceso bajo condiciones de luz. Por tal razón, es conveniente mantener los explantes en la obscuridad unos días antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja (Sánchez-Cuevas y Salaverría 2004; Gómez-Pineda, 2007).

El ácido ascórbico, que es soluble en agua, y la vitamina E, que es hidrofóbica y está asociada con las membranas (ver a continuación), proporcionan a las células una defensa contra la lesión oxidativa. La vitamina C puede eliminar el peróxido de hidrógeno perjudicial (Foyer et al., 1983; Thompson et al., 1987) y algunos otros radicales de oxígeno activados. Es responsable de reducir la forma oxidada de la vitamina E.

El ácido ascórbico se ha agregado a pocos medios publicados para el cultivo de tejidos vegetales y, por lo tanto, no es un ingrediente esencial. Varios investigadores han incluido pequeñas cantidades (es decir, 0.1-1.0 mg / l) sin evidencia de un efecto claramente beneficioso.

2.2.3. Propagación *in vitro* de *Strelitzia reginae*

El fracaso de los intentos de cultivo de tejidos en la propagación de *Strelitzia reginae* se debe en gran medida a la fenolización y al pardeamiento oxidativo de los explantes (Ziv y Halevy, 1983; Paiva et al., 2004, Kantharaju et al., 2008). La producción excesiva de polifenoles conduce al dorado y eventual muerte de los explantes (Ziv y Halevy, 1983, Pan y van Staden, 1998; Zeweldu y Ludder, 1998; Birmeta y Welander, 2004; Diro y van Staden, 2004). La lesión tisular estimula la producción de fenoles (Dodds y Roberts, 1995). Del

mismo modo se menciona que para prevenir la oxidación, se recomienda minimizar los daños causados al explante por medio de la remoción de compuestos fenólicos producidos y de alteraciones en la composición del medio de cultivo. La remoción de los compuestos puede realizarse mediante la utilización de medios líquidos, de diferentes agentes solidificantes, o de sustancias de adsorción, (George, 1996b; Duarte De Oliveira *et al.*, 2007).

Los tejidos de explantes de plantas que son susceptibles a la oxidación muchas veces son lavados en una solución de antioxidantes después de la esterilización, cortando en papel remojado con un antioxidante y/o sumergido en solución de un antioxidante inmediatamente después de cortar.

Los antioxidantes también han sido incorporados en el medio de cultivo, como la cisteína, carbón activado, polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico, que adicionado al medio siendo esterilizado con un filtro, y no en autoclave o ácido cítrico. Muchas de estas sustancias actúan adsorbiendo los exudados liberados por los explantes, que causan la oxidación (Jarret *et al.*, 1985; George, 1996b). Otras modificaciones en la composición de los medios de cultivo también pueden ser eficientes para controlar la oxidación como variaciones en la concentración de las sales del medio S, exclusión o disminución de hierro y cobre y variaciones en tipo y niveles de reguladores de crecimiento (Jarret *et al.*, 1985; Duarte De Oliveira *et al.*, 2007).

La adición de carbón activado (CA), a los medios de cultivo para adsorber sustancias tóxicas es ampliamente reportado (Horner *et al.*, 1977; Fridborg *et al.*, 1978; Weatherhead *et al.*, 1979; Theander y Nelson, 1988). Sin embargo, las propiedades de adsorción de AC son no selectivas y capaces de adsorber altas concentraciones de diversos reguladores de crecimiento

(Pan y Van Staden, 1998). Como se ha mencionado, la proporción y concentración de auxinas y citoquininas en los medios es un factor clave para determinar la regeneración de plantas con éxito (Razdan, 1993). De este modo, la adición de AC para disparar los medios de proliferación puede tener efectos adversos e inhibir el crecimiento y la regeneración *in vitro* (Pan y Van Staden, 1998); Por lo tanto, destacando la necesidad de introducir otro antioxidante para promover el crecimiento y la regeneración.

Existen trabajos realizados en *Strelitzia reginae* donde usan diferentes tipos de explantes (hojas, gemas, embriones, etc.), usando diferentes métodos de desinfección, aplicando antioxidantes como solución o aplicándolos en los medios de cultivos, esto debido a que como se ha dicho esta especie es susceptible a la oxidación; los tratamientos eficaces para la generación de brotes adventicios o embriones somáticos no han sido del todo exitosos.

North *et al.*, 2011 encontraron que el ácido ascórbico (AA), fue 20% más efectivo en la reducción de la oxidación completa del explante que el CA. En el mismo estudio indicaron que CA desempeñó un papel clave, y fue más eficaz que AA, en la reducción de la oxidación de plántulas en este punto de contacto sobre explantes de plántulas *in vitro* de *Strelitzia reginae*; del mismo modo la formación más alta de callos se formó en 0,5 mg.l⁻¹ NAA y 5 mg.l⁻¹ BAP, a partir de plántulas *in vitro*, en los de AA que en los tratamientos de CA.

El efecto que tuvo el tratamiento del ácido cítrico (150 ml L⁻¹), como antioxidante fue positivo si se sumergían los explantes por 24 horas, usando como explante retoños rizomatosos de *Strelitzia reginae*, ya que el porcentaje de mortalidad fue bajo (5%), y los días de iniciación de la formación del brote fueron de 9.5 días con mayor porcentaje de establecimiento (97,10%) en un medio que contenía medio Murashige y Skoog (1962) (MS),

más carbón activado (1,0%) suplementado con BAP (5 mg L⁻¹), esto debido a que la oxidación solo se presentó en la herida del explante y no en su totalidad, (Karnataka J., 2008).

De manera similar, Ziv y Halevy (1983) informaron en ave del paraíso que, remojando los explantes en solución de pretratamiento de ácido cítrico y ácido ascórbico durante 12 horas disminuye ligeramente, mientras que la inmersión de 24 horas reduce considerablemente la oxidación, (Karnataka J., 2008).

En un estudio sobre la germinación de embriones de *Strelitzia reginae* se registró que un medio MS al 50% fue más eficaz para reducir la necrosis y aumentar la supervivencia de los explantes; del mismo modo los autores mencionan que la incorporación de carbón activado a los medios de comunicación es una práctica reconocida y su influencia en el establecimiento de la cultura puede atribuirse a su capacidad de adsorción de sustancias inhibitoras en el medio de cultivo (Horner *et al.*, 1977, Fridborg *et al.*, 1978; Weatherhead *et al.*, 1979; Theander y Nelson, 1988) y drástica disminución de la oxidación fenólica (Carlberg *et al.*, 1983, Liu, 1993, Teixeira *et al.*, 1994, North *et al.*, 2011).

Duarte de Oliveira *et al.*, 2007, para el control de la oxidación en el cultivo *in vitro* de embriones de *Strelitzia reginae* se observa mayor eficiencia a medida en que se aumentaron las concentraciones de carbón activado, a partir de 2,0 g L⁻¹; en cuanto a la adición de PVP no fue eficiente para el control de la oxidación, a pesar de su mayor efectividad ya comprobada en otros cultivos (Fridborg Y Eriksson, 1965; Anagnostakis, 1974; Fridborg *et al.*, 1978; Tisserat, 1979; , Takayama Y Misawa, 1980, Bon *et al.*, 1988, Guerra Y Handro, 1988) y También En *Strelitzia reginae* (Ziv Y Halevy, 1983), por otro lado también concluyeron que la utilización de cisteína, ácido cítrico, ácido ascórbico, no es eficaz para

controlar la oxidación en el cultivo *in vitro* de embriones de ave de paraíso, (Duarte De Oliveira *et al.*, 2007).

La interacción entre las diferentes edades de los embriones las concentraciones del medio MS mostró significancia sólo para el análisis de oxidación, no influenciando, sin embargo, la altura de los brotes o la formación de raíces. Estos parámetros y también la presencia de oxidación fue significativamente influenciada por las concentraciones de sacarosa utilizadas en combinación con las diferentes edades de los embriones.

En el trabajo realizado por Paiva *et al.*, 2007 no pudieron propagar *Strelitzia reginae* por medio de segmentos foliares o gemas axilares, pero se lograron el desarrollo *in vitro* de plantas completas utilizando como explantes embriones inmaduros, con concluyeron que el nivel óptimo de sacarosa para el desarrollo de los embriones de 20 semanas es de 0,64 g L⁻¹ y las plantas de mayor tamaño se forman en ausencia o concentración de 0,5 mg L⁻¹ de BAP. En un estudio realizado en *Strelitzia reginae* los cultivos en condiciones de oscuridad y en presencia de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) formaron proembriones somáticos, aun cuando los explantes se hubieran oscurecido, (Arzate *et al.*, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación Del Experimento

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento (CIEAF), de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx).

3.2. Obtención del material vegetal

Las inflorescencias para el primer experimento se obtuvieron en el municipio de Valle de Bravo, Estado de México para la segunda y tercera parte del experimento el material se colecto en Villa Guerrero, Estado de México.

3.3. Desinfestación de flores

Se utilizó como explante primario secciones de ovario. Se utilizaron cinco de las flores de cada inflorescencia, en el Cuadro 1. Se muestra el tratamiento de desinfestación de las flores:

Cuadro 1. Tratamiento para la desinfestación para las flores de *Strelitzia reginae*.

Explante	Fungicida y bactericida (1:1) 30 min	Jabón comercial /agua corriente	NaClO (5min)	Ca(ClO) ₂ /10 min	Etanol (1min)	Enjuague con Agua destilada estéril (2)	Antioxidante 24hrs.
Flor/Ovario	1g L ⁻¹	10 min	5%	5%	70%	X	PVP (400 mg L ⁻¹) AA (400 mg L ⁻¹)

Hipoclorito de sodio (NaClO). Hipoclorito de calcio Ca(ClO)₂. Polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico (AA).

3.4. Establecimiento del cultivo *in vitro* de las secciones de ovario.

Se extrajeron 3 flores de cada inflorescencia, la cual estaba completamente cerrada, para seccionar los ovarios y fueran usados como explante primario, estos que se cortaron transversalmente.

Se realizaron tres experimentos el medio base fue el medio de cultivo será de Murashige y Skoog (1962) (MS) al 100% o al 50%, suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, con o sin carbón activado (CA) o polivinilpirrolidona (PVP) como antioxidantes, diferentes concentraciones de 2, 4, D y 7 g L⁻¹ de agar; el pH del medio de cultivo se ajustó entre 5.7 ± 0.1 con NaOH o HCl antes de adicionar el agar, posteriormente se esterilizó con autoclave a 121°C por 20 minutos. Cada frasco contenía 30 mL de medio de cultivo; los cultivos se

incubaron en oscuridad. En el Cuadro 3, se describen las características para cada experimento.

Cuadro 2. Tratamientos para inducción de embriones a partir de secciones de ovario y de *Strelitzia reginae*.

Experimento	Tratamiento	2, 4, D (mg L ⁻¹)	PVP(mg L ⁻¹) + AA(mg L ⁻¹)	CA (g L ⁻¹)
1 Explante; Ovario	1	0		
	2	1.0		
	3	2.0	--	1.0
	4	3.0		
	5	0		
	6	1.0		
	7	2.0	--	2.0
	8	3.0		
	9	0		
	10	1.0		
	11	2.0	400-0	
	12	3.0		
	13	0		
	14	1.0		1.0
	15	2.0	0-400	
	16	3.0		
	17	0		
	18	1.0		
	19	2.0	200-200	
	20	3.0		

En el experimento se realizaron dos repeticiones por tratamiento, cada repetición estuvo constituida por una caja Petri que contenía 10 secciones de ovario las cuales representaron

una unidad experimental. Todos los tratamientos fueron incubados en oscuridad a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 30 días.

3.5. Expresión de la embrogénesis

En esta fase del experimento se utilizaron los explantes de la fase anterior que contaron o no con oxidación; y fueron colocados en medio MS al 50% enriquecido con 15 g L^{-1} de sacarosa, con o sin CA, 7 g L^{-1} de agar y Fe-EDTA, en ausencia o presencia de 2, 4, D. El pH del medio de cultivo se ajustó entre 5.7 ± 0.1 con NaOH o HCl, antes de adicionar el agar, posteriormente se esterilizó con autoclave a 121°C por 20 minutos. Cada caja Petri contenía 30 mL de medio de cultivo.. A continuación se muestran los tratamientos en el Cuadro 4.

Cuadro 3. Tratamientos de expresión a partir de ovario de *Strelitzia reginae*.

Contenido	Medio 1	Medio 2	Medio 3
MS	50%	50%	50%
Sacarosa	15 g L^{-1}	15 L^{-1}	15 L^{-1}
CA	0.1 g L^{-1}	--	--
Agar	7 g L^{-1}	7 g L^{-1}	7 g L^{-1}
2, 4, D	0.1 mg L^{-1}	0.05 mg L^{-1}	--

Para el experimento se realizaron dos repeticiones por tratamiento, cada repetición estuvo constituida por una caja Petri que contenía 10 secciones de ovario las cuales representaron una unidad experimental. Todos los tratamientos fueron incubados en oscuridad a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de 20 días se tomaron datos.

Las variables a evaluar fueron:

- Grado de oxidación.
- Formación de embriones.

3.6 Análisis estadístico

En base a las observaciones visuales, el grado de oxidación se clasificó en una escala de 1 a 4 (1 = No oxidación y 4 = oxidación extrema), modificado de la escala de calificación dada por Ziv Y Halevy (1983). El grado de formación de callos se clasificó como: 1 = ninguno, 2 = bajo, 3 = medio y 4 = alto. Esta escala de calificación fue modificada de la dada por Ziv y Halevy, 1983, Duarte De Oliveira *et al.*, 2007).

Los datos sobre el grado de oxidación de los explantes se tomaron a intervalos semanales, por tratamiento después de 60 días de iniciado el cultivo.

El experimento constó de 20 **tratamientos** con 2 repeticiones, cada uno con diez explantes; en total fueron 400 unidades experimentales. La comparación de medias en los tratamientos se hará mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$), mediante el programa estadístico Statgraphics® versión 5.0 para Windows ®.

Comentado [Fn1]: Los datos para el estadístico solo serán si hay formación de callo o brotes

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Embriogénesis

La embriogénesis directa, es decir, la formación de embriones somáticos en tejidos explantados sin ninguna fase del callo intermedio, se observa con mucha mayor frecuencia *in vitro* que la formación de embriones adventicios *in vivo*. Los informes de embriogénesis directa *in vitro* han descrito principalmente su aparición en tejidos de gametofitos (generación de gametos), tejidos esporofíticos (plantas normales) estrechamente asociados con el gametofito, o tejidos que han surgido recientemente como consecuencia de la fertilización de gametos. Los explantes de los cuales es más probable que ocurra la

embriogénesis directa incluyen microsporas de polen dentro de la antera y tejidos de todo o parte del ovario [incluida la pared del ovario (o carpelos) Smith y Krikorian (1988)], óvulo (especialmente el nucelo), cigótico embrión o plántula joven. Fisiológicamente, estos explantes son todos muy juveniles (Michael A. Hall y Geert-Jan De Klerk, 2008).

A pesar de que se puede considerar el ovario de la especie estudiada (*Strelitzia reginae*) como un explante joven y funcional para la formación de embriones adventicios en el experimento demostró lo contrario, esto se puede deber a que en sí la especie contiene grandes cantidades de fenoles y exudados que no permiten la formación de embriones; se ha comprobado en diversos experimentos, con otro tipo de explante (hoja, raíz, etc.), que entre más grande sea la herida provocada, la cantidad de oxidación fenólica será mayor y el éxito de multiplicación es más complicada o nula.

En la primera semana después de establecido el experimento, sobre los explantes se formaron pequeñas estructuras acuosas, como se muestra en la figura 1., sin embargo no hubo un desarrollo, y estas consecutivamente perdían la forma y se esparcía el líquido sobre todo el explante o bien se absorbía en el mismo, esta reacción provocaba que los explantes se oxidaran por completo por lo cual se deduce que no eran células vegetales sino exudados del mismo material vegetal.

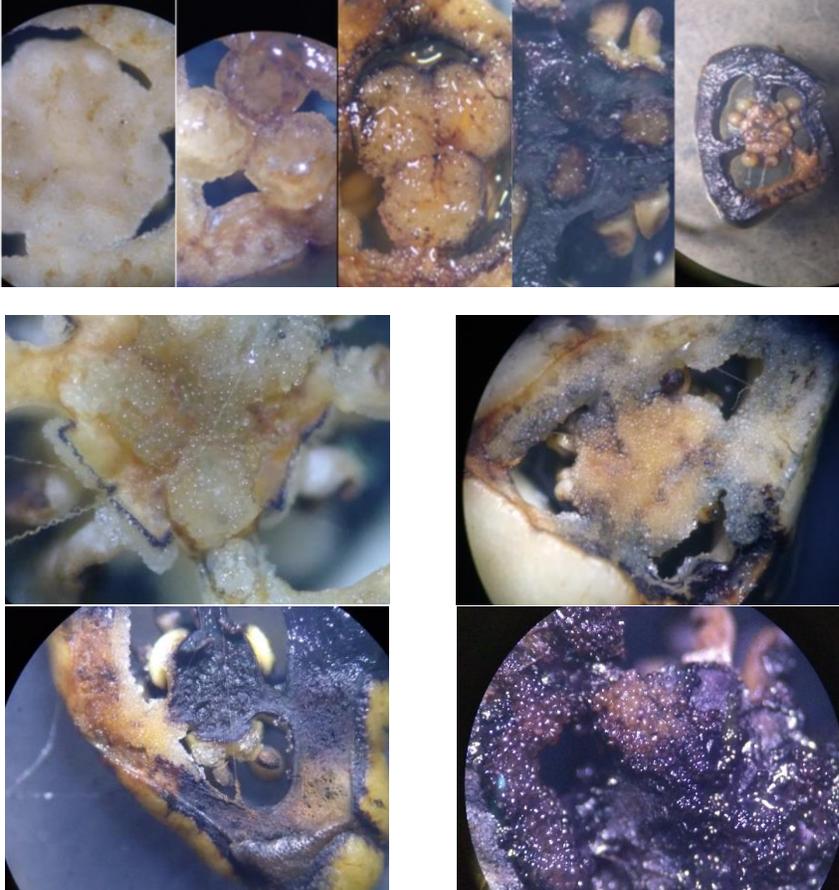


Figura 1. Secciones de ovario de *Strelitzia reginae* en diferentes etapas del cultivo a) Escala de clasificación de oxidación b) Tratamiento dos, a 7 días de establecido el cultivo, c) Tratamiento tres, a 14 días de establecido el cultivo, d) Tratamiento 18, a 21 días de establecido el cultivo, d) Tratamiento 15 y e) Tratamiento 9, pardeamiento en la superficie del explante la cuarta semana de iniciado el cultivo.

El ácido L-ascórbico es usado durante el aislamiento del explante y para prevenir el ennegrecimiento, como antioxidante, también se ve involucrada en la división celular y elongación, por ejemplo, en células de tabaco (de Pinto et al., 1999). El ácido ascórbico ($4-8 \times 10^{-4} \text{ M}$) mejoró la formación de brotes en callo de tabaco joven y viejo. (Joy et al., 1988;

Michael A. Hall y Geert-Jan De Klerk, 2008). A pesar de esto de lo mencionado en el experimento, la adición de este antioxidante no tuvo la misma respuesta, esto se debió porque la producción de fenoles no se pudo controlar con los antioxidantes usados en diferentes dosis, y el seccionar transversalmente el ovario provocó una gran herida, las cuales como sucedió en trabajos anteriores con secciones de hoja y raíz no favorecen el control de fenoles ni la formación de embriones ni callos.

4.2. Oxidación fenólica

Para medir el grado de oxidación fenólica de los explantes se tomaron datos a intervalos semanales. En base a observaciones visuales, se clasificó en una escala de 1 a 4 (1 = Nula oxidación, 2 = oxidación parcial, 3= Oxidación total y 4 = Pardeamiento oxidativo), modificado de la escala de calificación dada por Ziv Y Halevy (1983), se puede observar en la Figura 1, la escala de clasificación que se realizó.

A los siete días después de iniciado el cultivo se formaron pequeñas estructuras globulares cristalinas sobre los explantes en todos los tratamientos que contenían la hormona 2, 4, D, en diferentes cantidades, con o sin algún tipo de antioxidante, se determinó que estas estructuras eran fenoles y/o exudados producidos por el material vegetal, ya que estaban presentes en todos los tratamientos con excepción del testigo (Tratamiento 1); se reventaban al llegar al punto máximo de crecimiento o bien se absorbían o se esparcía por todo el explante (Figura 1).

El pardeamiento oxidativo se presentó gradualmente en todos los tratamientos de manera diferente. En la primera semana se oxidaron los tratamientos sin 2, 4, D y en explantes que tenían un grosor menor a 3mm, al mismo tiempo estos explantes oxidados no formaban los exudados en forma de gotas.

Los tratamientos en los cuales hubo mayor presencia de estos exudados y se presentó menor pardeamiento oxidativo, fueron: T2, T3, T4, T6 y T20, como se muestra en la Figura 2. Como se puede ver las concentraciones de PVP, AA y CA, difieren, por lo cual los resultados se deben a la calidad del explante, ya que en estos tratamientos el grosor y diámetro es mayor que en otros tratamientos.

En cuanto a los tratamientos con mayor cantidad de CA el explante se conservaba seco, mientras en tratamientos con menos cantidad de CA, los explantes permanecían acuosos (Figura 1d y 1e). Esto se debe a que el CA tiene propiedades para absorber compuestos secretados de tejidos cultivados o presentes en agar que de otra manera inhibirían el crecimiento (Michael A. Hall y Geert-Jan De Klerk, 2008).

El pardeamiento oxidativo se presentó en todos los tratamientos, debido al exceso de absorción de CA. La oxidación café acuosa se presentó en tres situaciones: explantes que no contenían hormonas, en secciones de ovario inferiores a 3mm, estas oxidaciones se dieron a la semana de establecido el cultivo; por último se daba esta oxidación por exceso de exudados que no se absorbían y se extendían en todo el explante.

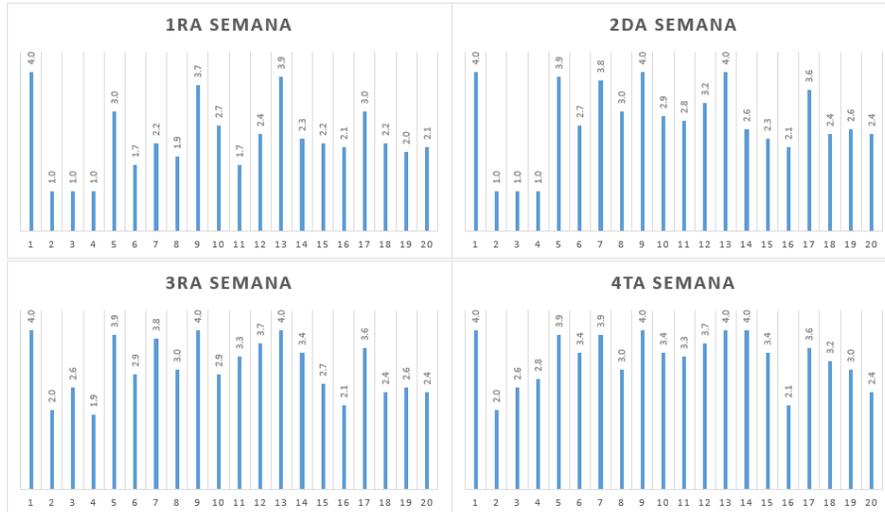


Figura 2. Promedio semanal del grado de oxidación de los 20 tratamientos de acuerdo a la escala modificada por Ziv y Halevy (1983): 1 = Nula oxidación, 2 = oxidación parcial, 3= Oxidación total y 4 = Pardeamiento oxidativo.

Es importante que debido a los resultados obtenidos en la primer etapa de establecimiento del cultivo *in vitro*, los explantes que se transfirieron a los medios de expresión, no tuvieron resultados.

4.3. Análisis estadístico

No se realizó un análisis estadístico ya que no hubo formación de callo embriogénico ni embriogénesis directa, en ningún tratamiento.

CONCLUSIONES

- El ovario es un explante joven que contiene meristemas pero las secciones de ovario no son el explante adecuado para generar embriogénesis directa.
- La oxidación fenólica no es controlada debido al tamaño de la herida.
- La aplicación de antioxidantes como PVP, AA y CA, no son eficaces para el control de la oxidación fenólica en el cultivo *in vitro* de secciones de ovario de *Strelitzia reginae*.
- Se debe probar con meristemas apicales, por ejemplo: óvulos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Odriozola Arizmendi J. M. y Albertos García J. 1972. El cultivo de la *Strelitzia*. Publicaciones de Extensión Agraria. Bravo Murillo, 101. Madrid. España.
2. George *et al.* (eds.), Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, 17. © 2008 Springer.
3. Reyes-Padilla B. A. Uso de L-cisteína y ácido ascórbico para reducir la oxidación durante el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano (*Musa spp.*) incubados bajo luz y oscuridad. Tesis de Licenciatura. Zamorano, Honduras. Abril, 2001.
4. Karnataka J. Effect of Antioxidant on *In vitro* Establishment of *Strelitzia reginae* Through Shoot Tip Explants. *Agric. Sci.*, 21(2): (324-325) 2008.
5. North, J. J., Ndakidemil P. A. and Laubscher C.P. Effects of various media compositions on the *in vitro* germination and discoloration of immature embryos of bird of paradise (*Strelitzia reginae*). *Plant O'mics Journals* 4(2):100-113, 2011.

6. North J. J., Ndakidemi P. A. and Laubscher C.P. Effects of various medium compositions and wounding treatments on *in vitro* growth and regeneration of bird of paradise (*Strelitzia reginae*). Scientific Research and Essays Vol. 7(10), pp. 1118-1133, 16 March, 2012.
7. Paiva P. D. de O. *et al.* Controle de oxidação no cultivo *in vitro* de embriões de estrelícia (*Strelitzia reginae*). Revista Brasileira de Horticultura Ornamental. v. 13, n.2, p. 107-112, 2007.
8. Paiva, P. D. de O. *et al.* Estabelecimento *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Banks.) Ciênc. agrotec., Lavras, v. 28, n. 5, p. 1031-1037, set.out., 2004.
9. Arzate Fernández, Amaury Martín; Piña Escutia, José Luis; Zavaleta Mancera, Hilda Araceli. Inducción de proembriones somáticos en ave del paraíso (*Strelitzia reginae* Banks). Revista Fitotecnica Mexicana, vol. 31, núm. 2, abril-junio, 2008, pp. 183-186. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México. 2008.
10. M.D. Vela, F.J. Macías, I.M. Monteiro, D.J. Arias y C. R. Vallotton. Estudio productivo del cultivo del ave del paraíso (*Strelitzia reginae*) como flor de corte: pruebas de germinación y utilización como planta ornamental. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Consejería de Innovación Ciencia y Empresa. Camino Esparragosa s/n. Chipiona, Cádiz, España. mariad.vela.ext@juntadeandalucia.es Dirección Regional de Agricultura de Algarve. Ministerio de Agricultura, Pesca e Forestales. Apartado 282 – Pataçao-8001-904 Faro, Portugal. Viveros Vallotton. Camino del Rincón s/n 21100 Aljaraque-Huelva, España. 2008.

Fuentes electrónicas

<https://www.floresyplantas.net/strelitzia-reginae/>

[http://sedagro.edomex.gob.mx/sites/sedagro.edomex.gob.mx/files/files/15%20Ave%20del%20para%C3%ADso%20\(gruesa\).pdf](http://sedagro.edomex.gob.mx/sites/sedagro.edomex.gob.mx/files/files/15%20Ave%20del%20para%C3%ADso%20(gruesa).pdf)