



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Centro Universitario UAEM Tenancingo



**EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE CUATRO VARIEDADES DE CRISANTEMO
(*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)**

TESIS

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

PRESENTA:

JANET GOMORA RASSO

Directora

Dra. Martha Elena Mora Herrera

Tenancingo, Estado de México; Abril de 2014.



Tenancingo, Estado de México; 25 de Marzo de 2014.

JANET GOMORA RASSO
PASANTE DE LA LICENCIATURA DE
INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA
P R E S E N T E

Por este conducto comunico a Usted, que con base en el Reglamento de Facultades y Escuelas Profesionales de la UAEM que en su Capítulo VIII artículo 120, 121 y 122, así como el Reglamento de Opciones de Evaluación Profesional de la UAEM Capítulo I artículo 6º, puede proceder a realizar la elaboración en formato electrónico del trabajo de tesis denominada **“Embriogénesis somática de cuatro variedades de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)”** y continuar con los trámites y requisitos requeridos para efecto de poder sustentar su examen profesional y obtener el título de **LICENCIADA EN INGENIERA AGRÓNOMA EN FLORICULTURA.**

Sin otro particular, quedo a sus apreciables órdenes.

Atentamente
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
“2014, 70 Aniversario de la Autonomía ICLA-UAEM”


QUÍM. VÍCTOR MANUEL DÍAZ VERTIZ
SUBDIRECTOR ACADÉMICO DEL CENTRO
UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO


Centro Universitario
UAEM Tenancingo

C. c. p. L. T. Gemma Irais Nava Pedroza .- Encargada del Departamento de Evaluación Profesional.
C. c. p. Archivo
VMDV/vlr.





Tenancingo, México a 25 de Marzo de 2014.

L. EN T. GEMMA IRAIS NAVA PEDROZA

ENCARGADA DEL DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL

CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO

PRESENTE:

En mi calidad de directora de la tesis titulada: **“Embriogénesis somática de cuatro variedades de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)”**, que presenta la **C. JANET GOMORA RASSO** pasante de Ingeniero Agrónomo en Floricultura; informo que se realizaron las correcciones sugeridas por los revisores, por lo cual ha concluido el proceso de escritura de dicho documento.

Sin más por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE

DRA. MARTHA ELENA MORA HERRERA

PROFESORA DE TIEMPO COMPLETO

CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO

c.c.p. Q. Víctor Díaz Vertiz. Subdirección Académica.

c.c.p Archivo



Tenancingo, México a 27 de febrero de 2014

L. en T. GEMMA IRAIS NAVA PEDROZA
ENCARGADA DEL DEPARTAMENTO DE
EVALUACION PROFESIONAL

PRESENTE:

En relación a su designación como revisor de la tesis titulada: "**Embriogénesis somática de cuatro variedades de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*)**". De la pasante de Ingeniero Agrónomo en Floricultura **Janet Gomora Rasso** emito mi dictamen:

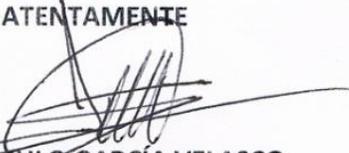
Aprobada con comentarios.

Los comentarios sugeridos son los siguientes.

1. Corregir acentuaciones y puntuaciones, marcados en el texto.
2. Corregir abreviaciones del sistema métrico decimal.
3. Corregir citas bibliográficas.
4. Justificar los títulos de los cuadros y figuras no deben ir centrados.
5. Los títulos de cuadros y figuras no deben ir en negritas, salvo la palabra **Cuadro 1** y/o **Figura 1**.

Sin más por el momento, Quedo de usted.

ATENTAMENTE


DR. ROMULO GARCÍA VELASCO
PTC-INVESTIGADOR DEL CU TENANCINGO



Tenancingo, México a 24 de Marzo de 2014

Asunto:
Dictamen de revisión de trabajo de tesis.

L. en T. GEMMA IRAIS NAVA PEDROZA
ENCARGADA DEL DEPARTAMENTO
DE EVALUACIÓN PROFESIONAL DEL CENTRO
UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO

El que suscribe: Juan Carlos Reyes Alemán le comunica que después de haber revisado la tesis denominada "**Embriogénesis somática de cuatro variedades de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*)**", que para obtener el título de Ingeniero Agrónomo en Floricultura somete la alumna **Janet Gómora Rasso**, he determinado el siguiente veredicto:

Aprobado con comentarios

Anexo a la presente la hoja de comentarios y el borrador del documento con correcciones, quedo de usted enviándole un atento saludo.

ATTE.

Dr. Juan Carlos Reyes Alemán
Profesor Investigador del Centro Universitario UAEM Tenancingo

c.c.p. Quim. Victor Manuel Díaz Vertiz. Subdirector Académico del Centro Universitario UAEM Tenancingo.





Hoja de comentarios

Del trabajo de tesis: **“Embriogénesis somática de cuatro variedades de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*)”**, que para obtener el título de Ingeniero Agrónomo en Floricultura en el Centro Universitario UAEM Tenancingo somete la alumna **Janet Gómora Rasso**.

Es un trabajo muy interesante, pero recomiendo realizar las correcciones de escritura que se indican al interior del borrador anexo.

Tenancingo, México a 24 de Marzo de 2014.



DEDICATORIA

A Dios por permitirme cumplir una meta muy importante en mi vida.

A mi familia:

A mis papás, María Susana Rasso Serrano y Valentín Gómora Zarza, gracias por su apoyo incondicional que me han brindado durante mis años de vida, por su cariño, comprensión, por los consejos y por toda la confianza que depositaron en mí, los quiero mucho.

A mis hermanos, Belén y Valentín. A mis sobrinos, Noé, Omar y Vanessa, y a mi cuñado Noé.

A mi abuelita Isabel, a pesar que ya no estás conmigo te recuerdo con admiración por tu gran ejemplo y por ser una persona que dejo huella en mí ser. En general a toda mi familia, por su cariño y respaldo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Estado de México, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Licenciatura. A los profesores del Centro Universitario UAEM Tenancingo por proporcionar los conocimientos para mi preparación académica.

A mis padres, porque este logro es también suyo.

Al COMECYT, por el apoyo del programa de Becas Tesis de Licenciatura.

Dra. Martha Elena Mora Herrera, por su apoyo que me brindó durante la realización de este trabajo, así como por la motivación para mi preparación académica.

Al Dr. Luis Miguel Vázquez García, por sus palabras de aliento, amistad y todo el apoyo que me ha brindado.

Dr. Rómulo García Velasco por la confianza, consejos, aportaciones académicas y palabras muy acertadas que nunca se olvidaran.

A todos mis amigos por su apoyo y cariño, principalmente a mi amiga incondicional, Mónica Irais Hernández Hernández, gracias por todo el cariño y consejos que me has compartido durante estos años de amistad.

A mis amigos y compañeros de clase Gloria, Juan, Liz, Aarón, Laura, Fer, Miguel, Anayely, Paco, Iván, Ime, Coral, Nico, Blanca, Anita y Ángel porque los momentos que convivimos dentro y fuera del salón de clases no se olvidaran. Un agradecimiento especial a mi amigo Juan Manuel, por todos los consejos y ánimos que me diste en todo el tiempo que hemos convivido.

CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Producción florícola.....	3
2.2. Generalidades del cultivo.....	3
2.3. Problemas del cultivo.....	4
2.4. Cultivo <i>in vitro</i>	5
2.5. Mejoramiento genético.....	6
2.5.1. Mejoramiento genético tradicional.....	6
2.5.2. Mejoramiento genético por Biotecnología.....	6
2.5.2.1. Embriogénesis somática.....	8
2.5.2.2. Células proembriogénicas.....	10
2.5.2.3. Embriogénesis somática directa.....	10
2.5.2.4. Organogénesis somática.....	11
2.5.2.5. Tipo de explante.....	12
2.5.2.6. Fitohormonas en la embriogénesis somática.....	12
III. JUSTIFICACIÓN	15
IV. OBJETIVOS	17
4.1. Objetivo general.....	17
4.2. Objetivos específicos.....	17
V. HIPÓTESIS	17

VI. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1. Sitio experimental.....	18
6.2. Material biológico.....	18
6.3. Medio de cultivo.....	18
6.3.1. Solución concentrada de 6-Bencil amino purina (6BAP).....	19
6.3.2. Solución concentrada de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D).....	19
6.3.3. Solución concentrada de thidiazuron (TDZ).....	19
6.4. Inclusión de yemas a condiciones <i>in vitro</i>	19
6.4.1. Esterilización de yemas.....	19
6.5. Cultivo <i>in vitro</i>	20
6.6. Condiciones del cultivo.....	20
6.7. Inducción de callos.....	20
6.8. Inducción de embriones.....	21
6.9. Análisis de resultados.....	22
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
7.1. Inclusión de yemas a condiciones <i>in vitro</i>	23
7.2. Inducción y formación de callos.....	25
7.3. Inducción de embriones somáticos.....	33
VIII. CONCLUSIONES	41
IX. RECOMENDACIÓN	42
X. BIBLIOGRAFÍA	43
XI. ANEXOS	50

Anexo 1. Preparación de soluciones madre del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).....	50
Anexo 2. Preparación de medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).....	52
Anexo 3. Peso total (mg) de 12 callos por cada tratamiento de las cuatro variedades de crisantemo.....	53
Anexo 4. Porcentaje (%) de formación de callo por cada tratamiento de las cuatro variedades de crisantemo.....	55
Anexo 5. Número de embriones somáticos formados en cada tratamiento.....	57
Anexo 6. Resumen en extenso del XVI Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas “Producción y protección de cultivos: Bajo un escenario de cambio climático”.....	58
Anexo 7. Lista de reactivos utilizados.....	66
Anexo 8. Equipo utilizado.....	68

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.

CUADROS.

	Pág.
Cuadro 1. Clasificación taxonómica del crisantemo (IAPT, 2011).....	4
Cuadro 2. Concentración de las fitohormonas en cada tratamiento del experimento para inducir callo.....	21
Cuadro 3. Concentración de las fitohormonas en cada tratamiento para inducir formación de embriones somáticos.....	22
Cuadro 4. Efecto de las fitohormonas 6BAP y 2,4-D sobre el peso (mg) de callos provenientes de explantes de tallo en cuatro variedades de crisantemo.....	27
Cuadro 5. Efecto de las fitohormonas 6BAP y 2,4-D sobre el peso (mg) de callos provenientes de explantes de raíz en cuatro variedades de crisantemo.....	29
Cuadro 6. Efecto de las fitohormonas 6BAP y 2,4-D sobre el peso (mg) de callos provenientes de explantes de hoja en cuatro variedades de crisantemo.....	31
Cuadro 7. Efecto del 6BAP y TDZ sobre la formación de embriones somáticos formados en seis tratamientos de tres variedades de crisantemo.....	37

FIGURAS.

	Pág.
Figura 1. Proceso de inclusión de yemas de crisantemo a condiciones <i>in vitro</i> : A) Plantas de crisantemo en invernadero; B) Colecta de esquejes de crisantemo; C) Corte de yemas; D) Esterilización de yemas; D) Cultivo de yemas en campana de flujo laminar y E) Cultivo <i>in vitro</i> de yemas.....	23
Figura 2. Reserva de microplantas de las variedades: A) Godorniz; B) Holandesa; C) Moreliana y D) Polaris white.....	25
Figura 3. Esquematización de la inducción de callo y organogénesis de diferentes explantes de crisantemo.....	26
Figura 4. Efecto de las fitohormonas 2,4-D y 6BAP sobre la formación de callos en explante de tallo de las variedades de crisantemo: A) Godorniz (tratamiento 8); B) Holandesa (tratamiento 2); C) Moreliana (tratamiento 3) y D) Polaris white (tratamiento 6).....	28
Figura 5. Efecto de las fitohormonas 2,4-D y 6BAP sobre la formación de callos en explante de raíz de las variedades de crisantemo: A) Godorniz (tratamiento 6); B) Holandesa (tratamiento 9); C) Moreliana (tratamiento 12) y D) Polaris white (tratamiento 3).....	30
Figura 6. Efecto de las fitohormonas 2,4-D y 6BAP sobre la formación de callos en explante de hoja de las variedades de crisantemo: A) Godorniz	

(tratamiento 11); B) Holandesa (tratamiento 8); C) Moreliana (tratamiento 6) y D) Polaris white (tratamiento 5).....	32
Figura 7. Esquematación de la inducción de embriogénesis y organogénesis de las variedades de crisantemo: Godorniz, Holandesa y Polaris white.....	34
Figura 8. Organogénesis directa en la variedad Moreliana, tratamiento con 0.3 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 0.3 mg L ⁻¹ de 6BAP, 28 días de cultivo.....	35
Figura 9. Brote de la variedad Holandesa de 28 días de cultivo con el tratamiento 6BAP 0.1 mg L ⁻¹	36
Figura 10. Oxidación de callos de la variedad Holandesa del tratamiento TDZ 1.0 mg L ⁻¹ a los 28 días de cultivo.....	36
Figura 11. Embriones formados en callos de las variedades: A) Godorniz tratamiento de TDZ 1.0 mg L ⁻¹ ; B) Holandesa tratamiento 6BAP 3.0 mg L ⁻¹ y C) Polaris white tratamiento TDZ 1.0 mg L ⁻¹	38
Figura 12. Estadios de los embriones somáticos de crisantemo variedad Holandesa: A) Globular; B) Corazón; C) Torpedo y D) Cotiledonar.....	38
Figura 13. Subcultivo de brotes indirectos a medio MS de las variedades de crisantemo: A) Godorniz tratamiento de 6BAP 0.1 mg L ⁻¹ ; B) Holandesa tratamiento de 6BAP 1.0 mg L ⁻¹ y C) Moreliana tratamiento de 2,4-D 0.3 mg L ⁻¹ y 6BAP 0.3 mg L ⁻¹ . Brotes de 2 semanas de subcultivo	

de las variedades de crisantemo D) Godorniz; E) Holandesa y F)

Moreliana.....

40

RESUMEN

En México, el crisantemo es uno de los principales cultivos florícolas de gran demanda en el mercado. El material ornamental mejorado genéticamente es importado de otros países, lo que provoca elevados costos para adquirir las plantas, además, de que requieren prácticas culturales altamente dependientes de agroquímicos para adaptarse a las nuevas condiciones del medio, de ahí la importancia de generar variedades en las regiones donde se cultivan. Los métodos tradicionales de mejoramiento genético requieren de largos periodos de tiempo para generar una nueva variedad, sin embargo, existen técnicas biotecnológicas que requieren de corto tiempo para regenerar variabilidad en condiciones *in vitro*, dentro de estas técnicas se encuentra la embriogénesis somática directa y la embriogénesis somática indirecta, la formación de callos generados a partir de explantes son utilizados en la embriogénesis somática indirecta. En este trabajo se incluyó a condiciones *in vitro* las variedades de crisantemo: Godorniz, Holandesa, Moreliana y Polaris white, a partir de plantas proporcionadas por un productor florícola, todas las variedades se desarrollaron adecuadamente.

La inducción de callo se realizó en explantes provenientes de hoja, raíz y tallo de las cuatro variedades de crisantemo. Se utilizaron 16 combinaciones de las fitohormonas 6BAP y 2,4-D, la evaluación de los explantes se realizó a los 28 días de cultivo. El explante de tallo formó callo en las 4 variedades evaluadas siendo no friables, aunque los explantes de raíz también presentaron formación de callo, estos fueron friables. La formación de callos a partir de hoja, fue lenta por lo que se evaluaron hasta los 56 días de cultivo, el peso de estos callos fue mayor a los formados por explantes de tallo y raíz, también se observó que no eran friables. Destacando que la relación de 1:1 de las fitohormonas 2,4-D y 6BAP, es la más eficiente para la inducción de callos en las variedades de crisantemo evaluadas.

Posterior a la formación de callo, se utilizaron callos de explantes de tallo y se realizaron 6 tratamientos con las fitohormonas 6BAP y TDZ para obtener embriones somáticos, obteniéndose en promedio, 7 embriones para la variedad Godorniz tratamiento de TDZ 1.0 mg L^{-1} , 4 embriones para la variedad Holandesa tratamiento de 6BAP 3.0 mg L^{-1} y 2 embriones para la variedad Polaris white tratamiento de TDZ 1.0 mg L^{-1} . En las variedades Godorniz y Holandesa también se observó la formación de organogénesis somática indirecta, mientras que la variedad Moreliana formó organogénesis somática directa en el tratamiento de inducción de callo por lo que no fue seleccionada para inducir embriones somáticos.

Cada variedad evaluada respondió de diferente manera ante los 16 tratamientos empleados para generar callo y para la formación de embriones somáticos, no importando que son variedades de la misma especie.

I. INTRODUCCIÓN

La actividad florícola en el Estado de México tiene sus antecedentes en 1955 cuando un grupo de japoneses inició con una producción de claveles en el municipio de Villa Guerrero (Fenner y Gebauer, 1992).

En la floricultura es fundamental cultivar especies resistentes a plagas y enfermedades que han sido obtenidas mediante la biotecnología e ingeniería genética. En México estos aspectos han sido profundamente descuidados, a pesar del potencial que tiene el país. En corporaciones holandesas, francesas y estadounidenses, es notable su participación en la creación de material genético florícola, que son logrados a partir de técnicas biotecnológicas, las cuales los floricultores mexicanos desconocen (Ceballos *et al.*, 2009).

En la biotecnología se encuentra el cultivo *in vitro*, que es una herramienta importante en cultivos de importancia económica, alimenticia o ecológica (Sánchez, 2012). Dentro de la biotecnología también se puede obtener un cultivar resistente a enfermedades, bien sea mediante la formación de un organismo transgénico o al generar variación somaclonal, en donde están presentes las mutaciones, los cambios epigenéticos y el efecto del rejuvenecimiento fisiológico; sin embargo, para utilizar estos mecanismos de mejoramiento genético *in vitro* se requiere el sistema de regeneración de una planta completa a través de embriogénesis u organogénesis somática, que permita la multiplicación, el enraizamiento y la aclimatación de los genotipos transformados o seleccionados (Vidales, 2002).

Para llevar a cabo cualquiera de los dos tipos de regeneración se necesita un medio de cultivo que este adicionado con fitohormonas, ya que estimulan la división celular, según la combinación y concentración de estas. La respuesta del tejido depende del tipo de fitohormona y la dosis utilizada, la cual actúa de

diferente manera para cada especie (Vidales, 2002). Por lo tanto, en la presente investigación se utilizaron diferentes dosis y combinaciones de fitohormonas para la formación de callo y la generación de embriogénesis somática. De esta forma, se pretende llevar a cabo las técnicas biotecnológicas para ser utilizadas en la generación de nuevas variedades para su posterior validación.

II. ANTECEDENTES

El desarrollo de la agricultura a través de los años, responde al hallazgo del mejoramiento de la calidad y aumento de la producción de los cultivos de interés. La evolución de las plantas ha permitido el mejoramiento de variedades más productivas en cultivos de importancia (Perea-Dallos, 1992).

2.1. Producción florícola.

En México, el 90% de la floricultura se encuentra en el Estado de México, principalmente en los municipios de: Tenancingo, Villa Guerrero, Coatepec Harinas e Ixtapan de la Sal. Los tres tipos de flores más vendidas en México son: rosas, crisantemos y claveles (Arboleda, 2008). El crisantemo ocupa el tercer lugar de importancia económica (Orozco y Mendoza, 2003) y se encuentra entre los tres cultivos ornamentales más importantes a nivel mundial, con gran valor económico y cultural (Boase *et al.*, 1997).

2.2. Generalidades del cultivo.

El crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) es una de las flores más antiguas cultivadas, con un importante significado en la cultura y vida tanto china como japonesa. El crisantemo, es originario de Asia, y China es su centro de origen, se dispersó por la India y llegó a Japón, se ha considerado como una flor emblemática ya que fue usada en escudos de armas, emblemas y motivos decorativos (Kiplinger, 1969). Pertenece a la familia Asteraceae (Cuadro 1) y es una de las flores cultivadas más antiguas (Piovano *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del crisantemo (IAPT, 2011).

Categoría taxonómica	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Dendranthema</i>
Especie	<i>Dendranthema grandiflora</i>
Variedad	Godorniz Holandesa Moreliana Polaris white

Es una planta de tallos herbáceos rara vez arbustiva; hojas alternas, dentadas y con márgenes de distintas formas; sus flores están arregladas en inflorescencias llamadas capítulos, compuesto de numerosas florecillas liguladas en la periferia y tubulares en el centro, las exteriores son más largas que las centrales; su propagación es por semilla y comercialmente se propaga vegetativamente por esqueje, estaquillas o *in vitro* (González *et al.*, 2007; Valle-Sandoval *et al.*, 2008).

2.3. Problemas del cultivo.

Los problemas más comunes a los que se enfrentan los productores es conseguir las plantas de las variedades más requeridas en el mercado y la sanidad del material (Piovano *et al.*, 2011).

La mejora para la obtención de híbridos comerciales se basa en la forma y el color, resistencia a plagas y enfermedades, así como en su adaptación para la producción de flores todo el año, incidiendo siempre en la calidad. La mayoría de las especies actuales se han generado a partir de cultivares originarios de China

como: *Chrysanthemum indicum*, *Chrysanthemum morifolium* y *Chrysanthemum x hortorum* (Barrera *et al.*, 2007).

La selección de material para un programa de mejoramiento genético debe tener características agronómicas, tales como vigor, resistencia a enfermedades, déficit hídrico, alto valor comercial, entre otras (Latado, 1993; en Otahola-Gómez *et al.*, 2001).

México se ha caracterizado por ser un país con grandes recursos genéticos ornamentales; no obstante aún no se tiene terminado el inventario y no se han realizado evaluaciones del estado de conservación. De acuerdo a Rzedowski (1995), 600 especies mexicanas se encuentran actualmente en catálogos de horticultura de diferentes países del mundo y 300 especies que no se encuentran en ningún catálogo, se cultivan en jardines y parques de nuestro país. A la mayoría de las 600 especies que se ubican en catálogos, se les ha realizado mejoramiento genético fuera de nuestro país, reingresando en forma de nuevas variedades, con mayor valor comercial, ejemplo de ello son especies de las familias de: cactáceas, orquidáceas, agaváceas, euforbiáceas, asteráceas, bromeliáceas, aráceas, entre otras. De las 300 especies que se localizan en jardines y parques de México, se encuentran en pleno uso; sin embargo, no se ha recurrido a hacer mejoramiento genético para la obtención de nuevos materiales (Vázquez, 2006).

2.4. Cultivo *in vitro*.

El cultivo *in vitro* es una herramienta importante en la selección, cruzamiento, y escalamiento de cultivos de importancia económica, alimenticia o ecológica (Sánchez, 2012). Permite obtener plantas libres de enfermedades y en corto tiempo sin perder su potencial genético y calidad sanitaria, facilita el cultivo de un gran número de plantas en una superficie pequeña y puede conservar material

biológico por periodos prolongados (Viloria, 2009). La propagación vegetativa *in vitro* o micropropagación puede ser una alternativa económicamente rentable, frente a los métodos de multiplicación clásicos (Peña, 2006). Las principales cualidades de la micropropagación son la rapidez y la multiplicación clonal de genotipos de plantas (Smith y Drew, 1990).

2.5. Mejoramiento genético.

2.5.1. Mejoramiento genético tradicional.

El mejoramiento genético de plantas tiene por finalidad la obtención de variedades con características de mayor rendimiento, calidad comercial y nutritiva, y/o resistencia a factores abióticos y bióticos adversos (Espinoza, S/A).

El empleo de los métodos tradicionales de mejora genética está limitado por varios factores, entre ellos; los largos periodos de selección mediante marcadores morfológicos, la complejidad del carácter a mejorar y la influencia del medio ambiente. En la actualidad, se emplea la transformación genética como método para el mejoramiento genético (Martínez *et al.*, 2012).

El mejoramiento de variedades de plantas ornamentales está desligado del proceso general de la producción agrícola, el cual generalmente se realiza mediante la utilización de los métodos de selección hasta los de transformación genética (Pérez *et al.*, 1998).

2.5.2. Mejoramiento genético por Biotecnología.

El surgimiento de las técnicas biotecnológicas permite manejar *in vitro* órganos, tejidos y células. Para la producción de semillas se requiere la máxima estabilidad

genética, y en el caso del mejoramiento genético este se basa en los cambios que transforman el material hereditario (Pérez *et al.*, 1998).

El proceso que emplean los fitomejoradores ha creado un sin número de variedades de plantas con el objeto de incrementar la producción, resistencia a plagas y enfermedades, y la adaptación a ambientes específicos, regiones y usos, mediante la selección de variedades cultivadas localmente, cruzadas entre sí o con las de otras áreas, o también con plantas silvestres que tengan los genes deseados. Sin embargo, obtener plantas mejoradas por estos medios resulta difícil en ocasiones por lo que se recurre a otros métodos para producir variantes útiles, tales como la selección celular, la variación somaclonal y las mutaciones inducidas, entre otros. La variación somaclonal espontánea y la inducción de mutaciones *in vitro*, son una fuente de variación de la que se pueden seleccionar características agronómicas de interés para el hombre (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Las técnicas de cultivo *in vitro*, tienen otras aplicaciones en los programas de mejora, como la obtención de plantas libres de virus mediante el cultivo de meristemos aislados, regeneración de plantas haploides y doblehaploides, hibridación somática por fusión de protoplastos, regeneración de plantas transgénicas a partir de cultivos embriogénicos transformados, desarrollo de técnicas de conservación de material vegetal, especialmente de crioconservación, establecimiento de ensayos de evaluación genética, rescate de embriones y producción de metabolitos secundarios de interés. En las últimas décadas, ha habido un rápido avance en el desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro* para uso en la propagación clonal y, para la regeneración de plantas a partir de células o tejidos reproducibles, que dan lugar a un material genéticamente confiable (Hernández, 2007).

La regeneración *in vitro* de plantas incluye la embriogénesis somática (formación de embriones somáticos), así como la organogénesis (formación de brotes o

raíces) generados a partir de la dediferenciación de células de explantes de tejido de la planta, procesos de morfogénesis que explantes *in vitro* seguirán para la regeneración de una planta completa (Christianson y Warnick, 1988).

En condiciones de cultivo *in vitro*, las células somáticas pueden regenerar embriones o brotes, raíces y/o flores como respuesta a un determinado estímulo (Radice, 2010). Seabrook y colaboradores (2001), señalaron que la regeneración de embriones somáticos a partir de tejido creciendo bajo condiciones *in vitro*, ha sido logrado para muchas plantas.

2.5.2.1. Embriogénesis somática.

La variabilidad genética constituye una alternativa muy importante en el mejoramiento tradicional, se pueden lograr nuevas variantes naturales a partir de tejidos somáticos, lo cual permite el hallazgo de mutaciones espontáneas en corto tiempo (Perea-Dallos, 1992).

La embriogénesis somática y la organogénesis son dos procesos morfogénicos en el cultivo *in vitro* de especies vegetales. Estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de células que, según las condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división celular (Radice, 2010). La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula dediferenciada, sin la necesidad de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979).

La característica más distintiva de un embrión somático es que constituye un nuevo individuo con estructura bipolar capaz de originar una planta completa, existen dos tipos de embriogénesis somática, la directa y la indirecta, en la primera los embriones aparecen directamente sobre el explante, en la segunda es indispensable obtener un tejido calloso o bien, una suspensión celular embriogénica (Pérez *et al.*, 1998).

En técnicas de cultivo de tejidos, la embriogénesis somática ha tenido un gran desarrollo en los últimos años y está ampliamente considerada como la mejor modalidad de regeneración basada en técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Las primeras descripciones de la obtención de embriogénesis somática fueron publicadas en zanahoria por Levine (1947), Steward (1958) y Reinert (1958) (Citados por Hernández, 2007).

Las células embriogénicas y meristemáticas son similares en cuanto al tamaño, tienen gran cantidad de ribosomas, citoplasma denso, un nucléolo agrandado y pequeños granos de almidón. Estas células se agrupan y pueden variar en tamaño y número. Dentro de un grupo de células embriogénicas, el desarrollo de las mismas no está sincronizado. Estas células son capaces de dividirse o de transformarse en embriones según las condiciones del medio de cultivo. Los embriones somáticos se forman a partir de grupos de células epidérmicas y subepidérmicas. Estas células pequeñas tienen una alta relación núcleo/citoplasma, citoplasma denso y un nucléolo voluminoso que se tiñe fuertemente. Se diferencian de las células embriogénicas por la falta de sustancias de reserva, por su delgada pared celular y su frecuente división celular. Estas estructuras se denominan proembriones globulares. En una etapa posterior desarrollan una epidermis, un tejido provascular, acumulan material de reserva y se polarizan. Estas estructuras globulares desarrollan cotiledones y se transforman en embriones somáticos que presentan ápices caulinar y radicular. En dicotiledóneas, la etapa globular es seguida por una etapa corazón que corresponde con la adquisición de la simetría bilateral: desarrollo de la epidermis de los estratos procambiales y de manera sucesiva el desarrollo del ápice radical. El ápice de tallo se desarrolla más tarde, durante la etapa cotiledonar. En los embriones somáticos de algunas especies hay una etapa intermedia entre la globular y corazón llamada oblonga, que corresponde a la individualización del ápice de la raíz y al procambium en respuesta a la elongación axial del embrión somático debido al transporte de auxinas (Radice, 2010).

2.5.2.2. Células proembriogénicas.

Un explante *in vitro* consiste de varios tipos de células. Las células al ser tratadas con reguladores de crecimiento, comienzan a desdiferenciarse y proliferar. Para la inducción del estado embriogénico los explantes requieren de extensos ciclos de células proliferando desorganizadamente. En presencia de auxinas endógenas, después de varios días una población de pequeñas células compactadas emergen (Nomura y Komamine, 1985).

Esas pequeñas y compactadas células divididas en forma asimétrica, se amontonan, las cuales se conocen como masas proembriogénicas o agrupamiento embriogénico. Sobre estas masas proembriogénicas se desarrollan los embriones somáticos (Zimmerman, 1993). La morfología de las células de un callo son muy diversas y varían según la apariencia externa, textura y composición celular, algunos callos consisten en tejidos duros compactos mientras que otros consisten de tejidos suaves, friables (Turrialba, 1987).

La embriogénesis también puede ser directa con células embriogénicas desarrolladas directamente del explante, o puede ser indirecta, con desorganizados ciclos mitóticos no embriogénicos interpuestos entre el explante de tejido diferenciado y estructuras embriogénicas reconocidas (Merkle, 1990; en Manzanilla, 2004).

2.5.2.3. Embriogénesis somática directa.

La embriogénesis somática directa, especialmente en ausencia de auxinas exógenas, está asociada con un periodo relativamente corto entre el tiempo de la iniciación cotiledonal y el comienzo de la maduración de los embriones (Maheswaran y Williams, 1986). La formación de embriones somáticos proviene

del establecimiento de la polaridad de las células indiferenciadas (Merkle *et al.*, 1990; en Manzanilla, 2004).

Todos los tejidos vegetales tienen capacidad para formar callos *in vitro*, aunque, relativamente pocos explantes tienen la habilidad para producir callos embriogénicos. Previamente se han usado como explantes: cotiledones, hipocotilos, ápices caulinares, segmentos de tallos, hojas, raíces e inflorescencias inmaduras (Litz y Jarret, 1993).

2.5.2.4. Organogénesis somática.

La organogénesis es un evento morfogénico que se caracteriza por su desarrollo de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente crecimiento de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos. Para lograr la formación de una planta completa por organogénesis, puede ser por vía directa o indirecta (Pérez *et al.*, 1998).

La organogénesis ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa y dentro de ella pueden diferenciarse dos vías: la formación de yemas axilares y la formación de yemas adventicias (Pérez *et al.*, 1998).

La formación de yemas axilares se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas o primordios de hojas (Hu y Wang, 1983). La formación de yemas adventicias se origina de una o de un grupo de células cuando se cultivan los explantes en medios con concentraciones elevadas de citoquininas (Vuylsteke y De Langhe, 1985).

La organogénesis o el tipo de órgano que se forma en el cultivo depende no solo de los reguladores exógenos presentes en el medio, sino también de los reguladores endógenos de procedencia del tejido o callo. Si el tejido o callo se transfiere de un medio carente de reguladores a un medio con alta concentración de auxinas, se pueden obtener brotes, sin embargo, esto no es universal para todas las especies (Jeremy, 1985; en Mora, 1991).

2.5.2.5. Tipo de explante.

Según Holst y colaboradores (1996), el tejido puede ser seleccionado a partir de tallos, hojas, secciones de hipocótilos, pétalos, meristemos apicales, ovarios, embriones cigóticos, tubérculos y filamentos de antera, esto debido a la totipotencialidad de las células vegetales.

Esta totipotencialidad celular fue enunciada por Haberlandt en 1902, quien propuso la teoría de que todas las células vegetales tienen la capacidad de regenerar plantas completas (Radice, 2010).

Los estudios definen el fenómeno de totipotencia como: cualquier célula de la planta que puede actuar como un sustituto del cigoto para iniciar una nueva planta (Kato y Takeuchi, 1963; en Manzanilla, 2004; Wetherell, 1984).

2.5.2.6. Fitohormonas en la embriogénesis somática.

Las fitohormonas son uno de los factores críticos en la composición del medio de cultivo ya que favorecen el desarrollo de estructuras a partir del explante en cultivo (Atree y Fowke, 1991).

Las hormonas y reguladores de crecimiento son compuestos que en pequeñas cantidades, fomentan, inhiben o modifican de alguna forma cualquier proceso

fisiológico vegetal (Weaver, 1990). Las hormonas vegetales se sintetizan en alguna parte de la planta y se traslocan a otra, en donde concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica (Salisbury y Ross, 1994).

La respuesta diferencial de una célula a un regulador de crecimiento va a depender del estado de competencia de esta, es decir, la hormona por sí sola no controla el patrón de diferenciación, y todas las células no van a responder de igual manera a dicha hormona, hay una interacción entre las necesidades de la célula y la cantidad y tipo de la hormona presente. Sin embargo, se han reportado algunos casos en donde el regulador de crecimiento puede controlar el patrón de diferenciación, principalmente la inducción de raíces en cultivo de callos (Smith y Grierson, 1982).

La totipotencia en la embriogénesis somática se ve afectada por la aplicación de hormonas exógenas, debido a que el uso de auxinas a altas concentraciones es necesario para causar la desdiferenciación y la estimulación de la totipotencia. Diferentes auxinas han sido usadas para este propósito: la auxina natural ácido indolacético (AIA) y otras sintéticas como el ácido naftalenacético (ANA), ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), plicoram, ácido picolínico y cinetina (Finstad *et al.*, 1993).

El 2,4-D es la auxina más eficiente y comúnmente la más utilizada para la promoción de embriogénesis somática ya que estimula la división celular y la proliferación de células preembriogénicas (Litz *et al.*, 1998).

En 1934, se identificó el AIA, que posibilitó el mantenimiento indefinido de callos de zanahoria y tabaco *in vitro*. Posteriormente se descubrió el efecto de la leche de coco por su contenido de ceatina como estimulante de la formación de callo sobre el cultivo de embriones de *Datura stramonium* (Radice, 2010).

En 1948 Skoog y Tsui, trabajando con cultivos de callo de tabaco, demostraron la existencia de una regulación química en la parte aérea y en la raíz. Trabajos posteriores en callos de la misma especie, con el agregado de cinetina, la primera citocinina descubierta, permitieron demostrar que la diferenciación de brotes, raíces o de ambos, era regulada por el balance de auxinas/citocininas (Radice, 2010). Tulecke y McGranahan (1985) utilizaron la combinación de auxinas y citocininas para inducir embriogénesis somática.

Iantcheva y colaboradores (1999; en Manzanilla, 2004) reportaron en *Medicago* la inducción de embriogénesis somática en alta frecuencia con el uso de thidiazuron (TDZ) y 6-Bencil amino purina (6BAP). Mithila y colaboradores (2003) indujeron con TDZ embriogénesis somática a partir de explantes de violeta africana. Hodson de Jaramillo y colaboradores (2008), reportaron la presencia de tejidos indiferenciados para tres variedades de crisantemo (Escapade, White albatross y Yellow albatross), donde la citocinina 6BAP estimuló la producción de callos. Aunque, el empleo de auxinas es la mejor manera de inducir la formación de células somáticas (Pérez *et al.*, 1998).

III. JUSTIFICACION

Las prácticas culturales del hombre han cambiado a través del paso del tiempo y esto ha llevado al uso de variedades de importancia alimenticia y económica con una combinación de caracteres que permiten producir elevados rendimientos de alta calidad.

La labor principal del fitomejorador es encontrar o crear grupos de plantas con las combinaciones de genes que produzcan el desarrollo más favorable bajo un determinado conjunto de condiciones, pero esto es a largo plazo.

En nuestro país se ha observado el incremento del consumo de variedades ornamentales mejoradas, sin embargo, el problema es la falta de interés en crear variabilidad obtenida a partir de especies nativas de nuestro país y así poder disminuir el consumo de semillas y plantas mejoradas de importación, que son de alto costo para los agricultores.

El mejoramiento genético puede tener efectos positivos en la economía de agricultor, al que le es difícil adquirir variedades que son mejoradas en otros países, recientemente se ha incrementado la investigación para la obtención de variedades modificadas genéticamente con el afán de que puedan ser reproducidas en nuestro país y comercializarlas.

Actualmente existen varios métodos de mejoramiento genético de los cultivos: en las especies con autofecundación, en las variedades de polinización cruzada y en plantas de propagación asexual. El cultivo *in vitro* permite propagar de forma asexual y obtener clones con las características deseables de una planta.

Esta investigación tuvo como propósito inducir embriones somáticos de cuatro variedades de crisantemo. Debido a que esta tecnología podría permitir la

obtención de variabilidad genética en menor tiempo que los métodos tradicionales de mejoramiento genético.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Obtener embriones de cuatro variedades de crisantemo, empleando embriogénesis somática.

4.2. Objetivos específicos.

- Incluir a condiciones *in vitro* las variedades de crisantemo, Godorniz, Holandesa, Moreliana y Polaris white.
- Inducir formación de callo utilizando explantes provenientes de segmentos de hoja, tallo y raíz, y diferentes concentraciones de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-Bencil amino purina (6BAP).
- Inducir embriogénesis somática a partir de callo empleando thidiazuron (TDZ) y 6-Bencil amino purina (6BAP).

V. HIPÓTESIS

El empleo de auxinas y citocininas en explantes vegetales de crisantemo puede inducir embriogénesis somática *in vitro*, debido a la capacidad de totipotencialidad de las células vegetales.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Sitio experimental.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal del Centro Universitario UAEM Tenancingo, Estado de México.

6.2. Material biológico.

Las plantas de crisantemo variedad Godorniz, Holandesa, Moreliana y Polaris white, fueron proporcionadas por un productor florícola en la localidad de Zacango la Baja, municipio de Villa Guerrero, Estado de México.

6.3. Medio de cultivo.

El medio básico de cultivo que se utilizó fue MS (Murashige y Skoog, 1962) como se describe en Espinoza y colaboradores (1986), se preparó con sales inorgánicas (Anexo 1), adicionando cantidades por litro de: 100 mL de sales, 10 mL de inositol, 5 mL de hierro, 1 mL de tiamina, 2 mL de pantotenato de calcio, 0.5 mL de glicina, 10 mL de sulfato de magnesio y 30 g de azúcar, se aforó a un litro con agua destilada y se ajustó a un pH de 5.6-5.7 con hidróxido de potasio (KOH), después se le adicionó el agar, 6 g por litro y se disolvió con calor (Anexo 2). Posteriormente se colocaron 20 mL del medio en cada frasco tipo “gerber®” de 65 X 45 mm.

El material de laboratorio que se utilizó en la micropropagación (cajas petri, pinzas y mango de bisturí) y el medio de cultivo se esterilizaron durante 20 minutos en una autoclave, a una temperatura de 120°C.

6.3.1. Solución concentrada de 6-Bencil amino purina (6BAP).

Para todas las concentraciones de 6BAP (Anexo 7) utilizadas en este trabajo, se realizó una solución concentrada de 10 mg/100 mL. La 6BAP se disolvió con 0.5 mL de KOH 1N y se aforó a 100 mL de H₂O (destilada).

6.3.2. Solución concentrada de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D).

Para todas las concentraciones de 2,4-D (Anexo 7) utilizadas en este trabajo, se realizó una solución concentrada de 10 mg/100 mL. El 2,4-D se disolvió con 0.5 mL de KOH 1N y se aforó a 100 mL de H₂O (destilada).

6.3.3. Solución concentrada de thidiazuron (TDZ).

Para todas las concentraciones de TDZ (Anexo 7) utilizadas en este trabajo, se realizó una solución concentrada de 10 mg/100 mL. El TDZ se disolvió con 0.5 mL de KOH 1N y se aforó a 100 mL de H₂O (destilada).

6.4. Inclusión de yemas a condiciones *in vitro*.

En el laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal del Centro Universitario UAEM Tenancingo se deshojaron los tallos, protegiendo las yemas; se cortaron segmentos de aproximadamente 0.5 mm que contenían una yema.

6.4.1. Esterilización de yemas.

Los segmentos de crisantemo fueron lavados, agitándolos en una solución de detergente (Roma®), 2 g en 100 mL de agua durante 2 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril.

Después se lavaron agitándolos en una solución de etanol al 70%, (v/v) con agua destilada durante 30 segundos y se enjuagaron con agua destilada estéril. Posteriormente se pasaron a una solución de cloro (Clorox®) al 30% (v/v) agregando 0.5 mL de Tween 20, se agitó la solución con los segmentos y se dejaron reposar durante 15 minutos, después se enjuagaron con agua destilada estéril para eliminar los residuos de la solución de cloro. Por último, se mantuvieron en agua destilada estéril a temperatura ambiente hasta el momento del cultivo en medio de cultivo MS (Sánchez, 2012).

6.5. Cultivo *in vitro*.

La inclusión de yemas se realizó en una campana de flujo laminar horizontal, previamente desinfectada. Se retiró el tejido oxidado de los segmentos, por efecto de la esterilización y se colocaron 5 yemas en el medio MS de forma vertical y distribuyéndolas en el frasco con medio de cultivo, con lo cual se mantuvo una fuente permanente de material biológico.

6.6. Condiciones del cultivo.

Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en un cuarto de incubación con un fotoperiodo de 16 horas luz y una temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Cada día se revisó la supervivencia de los esquejes (esquejes verdes), realizando labores de mantenimiento como desechar material contaminado o trasplante a nuevo medio.

6.7. Inducción de callos.

El medio de cultivo que se utilizó fue MS, suplementado con las fitohormonas; citocinina, 6BAP y la auxina 2,4-D (Mata-Rosas *et al.*, 2006), con concentraciones

de 2,4-D a 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 mg L⁻¹ y BAP a 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 mg L⁻¹. Se ajustó a un pH de 5.6-5.7. El experimento estuvo conformado por 16 tratamientos (Cuadro 2) con 8 explantes cada uno.

Cuadro 2. Concentración de las fitohormonas en cada tratamiento del experimento para inducir callo.

		2,4-D mg L ⁻¹			
		0.1	0.3	1.0	3.0
6BAP mg L ⁻¹	0.1	t1	t2	t3	t4
	0.3	t5	t6	t7	t8
	1.0	t9	t10	t11	t12
	3.0	t13	t14	t15	t16

t= Tratamiento

Se utilizaron microplantas de 28 días de edad, de las cuales fueron obtenidos los explantes de segmentos de hoja, raíz y tallo, de cada variedad, colocando cuatro segmentos en cada frasco tipo “gerber®” de 65 X 45 mm con 20 mL del medio de cultivo.

Los explantes de tallo y raíz se cortaron en segmentos de aproximadamente 0.3 cm de longitud, provocando pequeñas heridas en estos, teniendo precaución de no colocar yemas. A la hoja se le quitaron los márgenes y los explantes fueron cuadros de aproximadamente 0.3 cm, estos explantes contenían parte de la nervadura principal.

6.8. Inducción de embriones.

A los 28 días del cultivo de explantes de tallo de las 4 variedades, se tomaron los callos formados y se colocaron en medio MS suplementado con TDZ o 6BAP (Manzanilla, 2004; Del Rivero-Bautista *et al.*, 2008) para la formación de

embriones, se realizaron 6 tratamientos (Cuadro 3). Los tratamientos se ajustaron a un pH de 5.6-5.7.

Cuadro 3. Concentración de las fitohormonas en cada tratamiento para inducir formación de embriones somáticos.

	0.1 mg L ⁻¹	1.0 mg L ⁻¹	3.0 mg L ⁻¹
6BAP	t1	t2	t3
TDZ	t4	t5	t6

t= Tratamiento

6.9. Análisis de resultados.

Se obtuvieron los promedios de los datos experimentales de formación de callo, el promedio de peso de los callos se realizó con base en el porcentaje de formación de callo, se tomó como 100% 8 explantes por cada tratamiento. Para el caso de los embriones somáticos se contabilizaron los embriones formados sobre los callos, cada tratamiento estuvo conformado por 12 callos.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Inclusión de yemas a condiciones *in vitro*.

La inclusión de las variedades (Fig. 1): Godorniz, Holandesa, Moreliana y Polaris white a condiciones *in vitro*, se consideró cuando se logró obtener plantas libres de contaminación en el medio de cultivo.

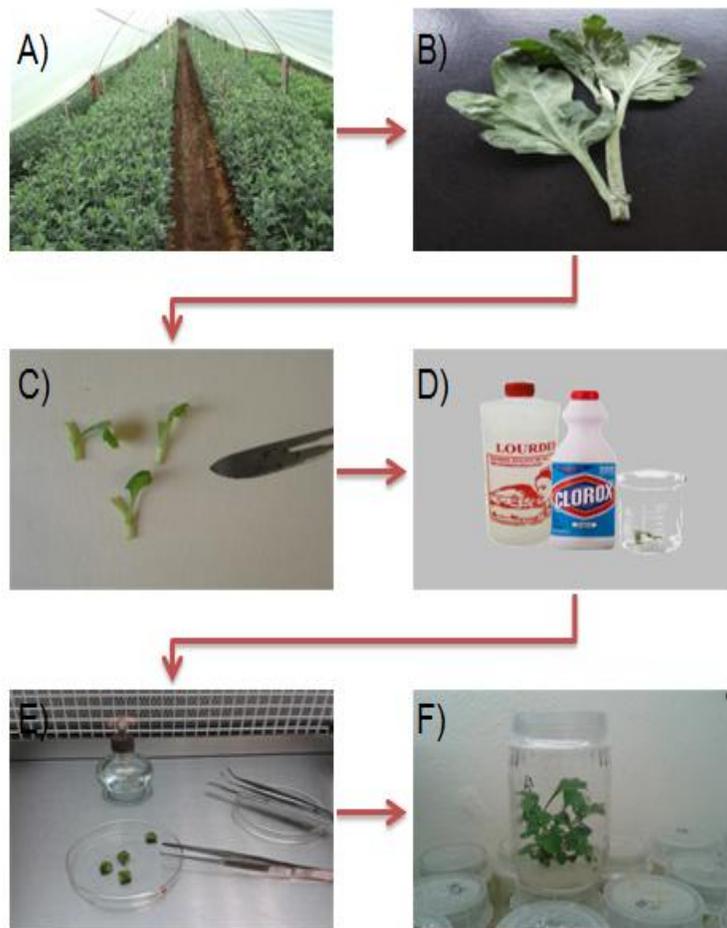


Figura 1. Proceso de inclusión de yemas de crisantemo a condiciones *in vitro*: A) Plantas de crisantemo en invernadero; B) Esquejes de crisantemo; C) Corte de yemas; D) Esterilización de yemas; D) Cultivo de yemas en campana de flujo laminar y E) Cultivo *in vitro* de yemas.

El principal problema que se encontró en el proceso de inclusión, fue que algunas yemas se oxidaron, probablemente por el proceso de esterilización; para rescatar este material se hicieron subcultivos de las yemas a medio MS, eliminando la parte oxidada.

En este proceso se observó que las cuatro variedades mostraron diferente comportamiento en su desarrollo; la variedad Polaris white y Godorniz fueron las que no presentaron oxidación en el primer cultivo *in vitro*, mientras que en la variedad Holandesa las yemas se oxidaron y fue necesario el subcultivo de las yemas, en la variedad Moreliana las microplantas presentaron menor altura en comparación con las otras tres variedades. El objetivo de la inclusión *in vitro* fue tener por lo menos una yema en desarrollo, para escalar la producción.

Las diferencias en el desarrollo en condiciones *in vitro* de las plantas de las cuatro variedades empleadas en este estudio coinciden con la investigación de Vences-Contreras y colaboradores (2009), quienes estudiaron once variedades de crisantemo, entre ellas Polaris white, ellos mencionaron que fue posible llevar a cabo la micropropagación de diversas variedades sin mostrar dificultades para su producción *in vitro*, así mismo evidencian la importancia del genotipo de cada variedad.

Posteriormente a la inclusión de yemas, se conservó una reserva de plantas de 28 días de cultivo *in vitro* de las cuatro variedades (Fig. 2), para realizar los experimentos de inducción de callo a partir de explantes de hoja, raíz y tallo.

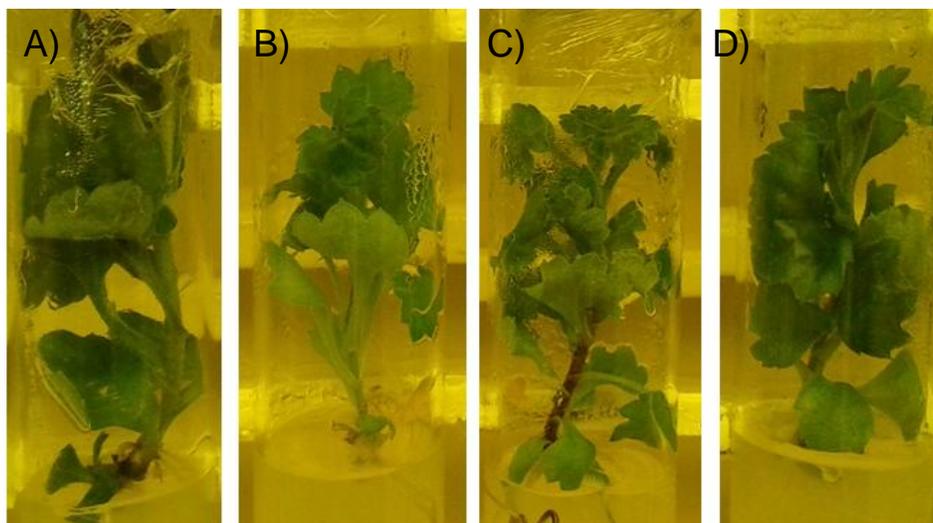


Figura 2. Reserva de microplantas de las variedades: A) Godorniz; B) Holandesa; C) Moreliana y D) Polaris white.

7.2. Inducción y formación de callos.

A los 28 días del cultivo de los diferentes explantes en diferentes concentraciones hormonales (Fig. 3) de las cuatro variedades de crisantemo (Cuadro 2), se realizó la evaluación del peso (Anexo 3), porcentaje de formación (Anexo 4) y friabilidad de callos. El explante de tallo fue el que presentó mayor porcentaje de formación de callo en todos los tratamientos para las cuatro variedades con respecto a raíz y hoja (Cuadro 4), además estos callos no presentaron friabilidad (Fig. 4).

Los resultados mostraron respuesta diferencial entre el tratamiento hormonal y tipo de explante entre variedades, así, los callos formados de tallo de la variedad Holandesa tuvieron mayor peso que los callos de las otras tres variedades.



Figura 3. Esquematización de la inducción de callo y organogénesis de diferentes explantes de crisantemo.

Es importante destacar que en los tratamientos del 7 al 11 hubo mayor respuesta de formación de callo de explantes de tallo. En los tratamientos del 1 al 4, las variedades Moreliana y Godorniz no formaron callo (Cuadro 4).

Diversos estudios han demostrado que no existe una combinación de citocininas y auxinas que sea estándar para todas las variedades de crisantemo, ya que esta respuesta es determinada por el genotipo (Teixeira, 2003).

Cuadro 4. Efecto de las fitohormonas 6BAP y 2,4-D sobre el peso (mg) de callos provenientes de explantes de tallo en cuatro variedades de crisantemo.

		Variedad			
		Godorniz	Holandesa	Moreliana	Polaris white
Tratamientos Relación 6BAP/2,4-D mg L⁻¹.	1 (0.1/0.1)	0	210.4*	0	39.5
	2 (0.1/0.3)	0	351.3*	194.0	109.5*
	3 (0.1/1.0)	0	190.5*	0	174.9*
	4 (0.1/3.0)	0	209.9*	0	116.7
	5 (0.3/0.1)	96.0*	199.9*	177.4*	171.7
	6 (0.3/0.3)	114.8*	77.5*	101.3*	77.4*
	7 (0.3/1.0)	121.5*	89.3	146.6*	109.0*
	8 (0.3/3.0)	72.8*	149.8*	128.0*	66.9*
	9 (1.0/0.1)	85.4*	76.5*	175.6*	89.5*
	10 (1.0/0.3)	115.0*	88.8*	137.9	52.6*
	11 (1.0/1.0)	81.3	99.8	104.0*	30.8*
	12 (1.0/3.0)	3.3*	4.7	4.6*	4.8
	13 (3.0/0.1)	68.0	120.0*	142.9*	101.6*
	14 (3.0/0.3)	71.8*	56.5*	49.4*	53.9
	15 (3.0/1.0)	50.5	138.6*	108.9*	37.9*
	16 (3.0/3.0)	17.3*	41.8*	89.0*	51.4*

*Tratamiento con 100% de formación de callos. Los resultados son el promedio de 8 explantes por tratamiento.

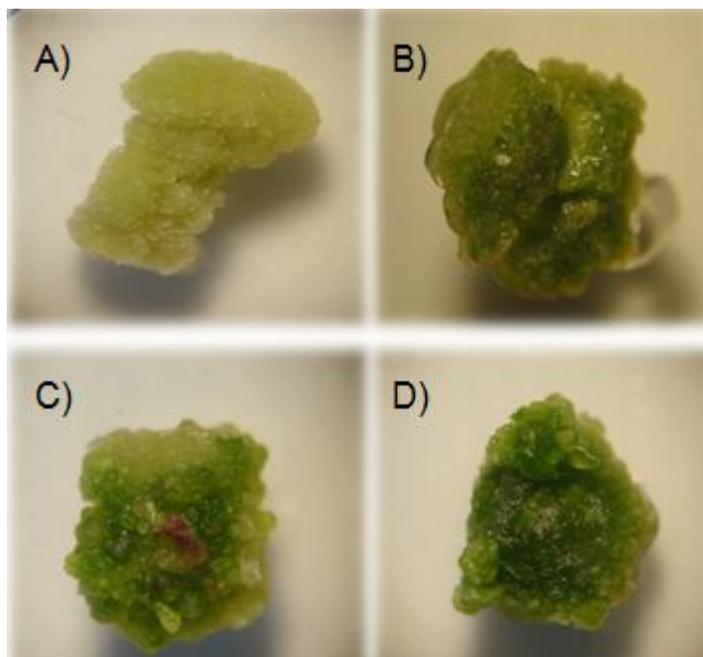


Figura 4. Efecto de las fitohormonas 2,4-D y 6BAP sobre la formación de callos en explante de tallo de las variedades de crisantemo: A) Godorniz (tratamiento 8); B) Holandesa (tratamiento 2); C) Moreliana (tratamiento 3) y D) Polaris white (tratamiento 6).

En el explante de raíz hubo formación de callo en los tratamientos del 6 al 15, con el 100% de formación de callo en Moreliana (Cuadro 5). Sin embargo, los callos formados de explante de raíz fueron 100% friables (Fig. 5) y presentaron menor peso que los de tallo a los 28 días de cultivo. Los resultados obtenidos en la inducción de callo a partir de explantes de raíz concuerdan con la investigación que realizaron Alarcón y colaboradores (2006), ellos mencionan que la formación de callo a partir de explantes de raíz en plantas de Achiote (*Bixa orellana* L.) no resultó masiva y los porcentajes de inducción fueron bajos, en comparación con los explantes de tallos y hojas, inclusive utilizando otras hormonas y otras concentraciones, aunque encontraron que la formación de callo de raíz se ve favorecida utilizando las fitohormonas ácido α -naftalenacético y 6-furfurilaminopurina.

Cuadro 5. Efecto de las fitohormonas 6BAP y 2,4-D sobre el peso (mg) de callos provenientes de explantes de raíz en cuatro variedades de crisantemo.

		Variedad			
		Godorniz	Holandesa	Moreliana	Polaris white
Tratamientos Relación 6BAP/2,4-D mg L⁻¹.	1 (0.1/0.1)	0	33.8	0	0
	2 (0.1/0.3)	0	0	0	160.5
	3 (0.1/1.0)	0	0	0	173.0*
	4 (0.1/3.0)	0	0	0	0
	5 (0.3/0.1)	15.8*	10.5*	56.4	75.5
	6 (0.3/0.3)	30.8*	16.7	84.5*	74.4
	7 (0.3/1.0)	27.0	19.7	47.5*	26.6*
	8 (0.3/3.0)	30.4	14.6	22.6*	16.9
	9 (1.0/0.1)	43.3	13.0*	25.8*	13.1*
	10 (1.0/0.3)	14.9	24.3	45.0*	12.1*
	11 (1.0/1.0)	13.8	9.4*	15.4*	22.6*
	12 (1.0/3.0)	4.6	6.6*	5.6*	4.7
	13 (3.0/0.1)	18.4	37.1*	55.5*	30.0*
	14 (3.0/0.3)	6.8*	8.5*	40.7	11.6*
	15 (3.0/1.0)	11.8	19.4	41.9*	23.6
	16 (3.0/3.0)	5.4*	6.8*	21.1	9.6

*Tratamiento con 100% de formación de callos. Los resultados son el promedio de 8 explantes por tratamiento.

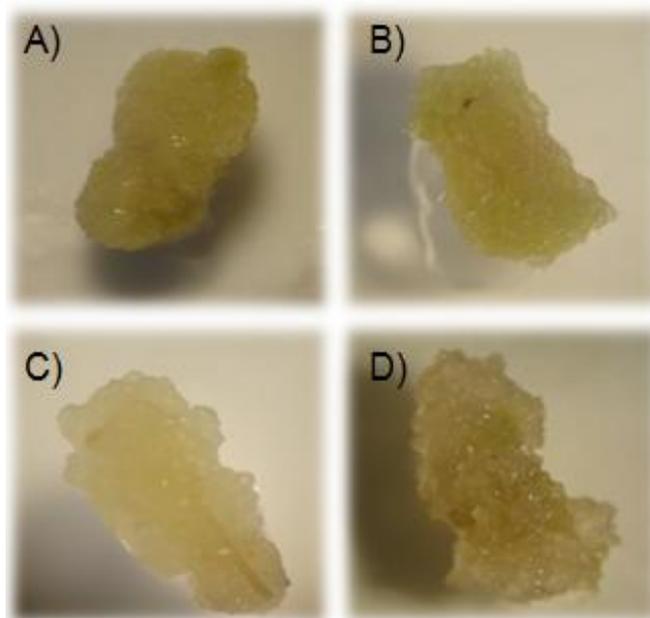


Figura 5. Efecto de las fitohormonas 2,4-D y 6BAP sobre la formación de callos en explante de raíz de las variedades de crisantemo: A) Godorniz (tratamiento 6); B) Holandesa (tratamiento 9); C) Moreliana (tratamiento 12) y D) Polaris white (tratamiento 3).

En el caso del explante de hoja, la formación de callo se evaluó hasta los 56 días de cultivo, debido a que el crecimiento del mismo fue muy lento comparado con los explantes de tallo y raíz en las cuatro variedades.

A los 56 días de cultivo el 100% de los explantes de hoja en las cuatro variedades formaron callo (Cuadro 6). Siendo Godorniz y Moreliana las que tuvieron mayor peso promedio y con un 100% de callos no friables (Fig. 6), esto indica que aunque, el explante de hoja tarda más tiempo en formarse, presenta mayor calidad. En la investigación de Teixeira y Fukai (2003), indican que los explantes provenientes de tallo en crisantemo han mostrado mayor capacidad para inducir callo que los de peciolo y hojas, dependiendo del genotipo de cada variedad y el tiempo que tardan para inducir formación de callo.

Cuadro 6. Efecto de las fitohormonas 6BAP y 2,4-D sobre el peso (mg) de callos provenientes de explantes de hoja en cuatro variedades de crisantemo.

		Variedad			
		Godorniz	Holandesa	Moreliana	Polaris white
Tratamientos Relación 6BAP/2,4-D mg L⁻¹.	1 (0.1/0.1)	254.4*	238.8*	375.6*	263.8*
	2 (0.1/0.3)	127.3*	112.6*	148.1*	248.6*
	3 (0.1/1.0)	351.6*	150.5*	523.8*	273.1*
	4 (0.1/3.0)	272.6*	110.6*	257.3*	63.6*
	5 (0.3/0.1)	842.3*	260.6*	698.9*	564.6*
	6 (0.3/0.3)	872.9*	250.8*	533.8*	583.8*
	7 (0.3/1.0)	726.4*	340.9*	880.6*	580.6*
	8 (0.3/3.0)	722.0*	275.0*	609.4*	327.9*
	9 (1.0/0.1)	525.8*	519.1*	516.9	352.3*
	10 (1.0/0.3)	554.4*	538.8*	603.0*	483.3*
	11 (1.0/1.0)	501.0*	546.4*	502.4*	378.3*
	12 (1.0/3.0)	207.5*	216.8*	331.0*	207.5*
	13 (3.0/0.1)	792.8*	787.0*	745.5*	691.0
	14 (3.0/0.3)	456.8*	728.5*	678.8*	563.9*
	15 (3.0/1.0)	528.8*	787.5*	1,276.9*	548.5*
	16 (3.0/3.0)	283.0*	1,182.3*	709.4*	268.1*

*Tratamiento con 100% de formación de callos. Los resultados son el promedio de 8 explantes por tratamiento.

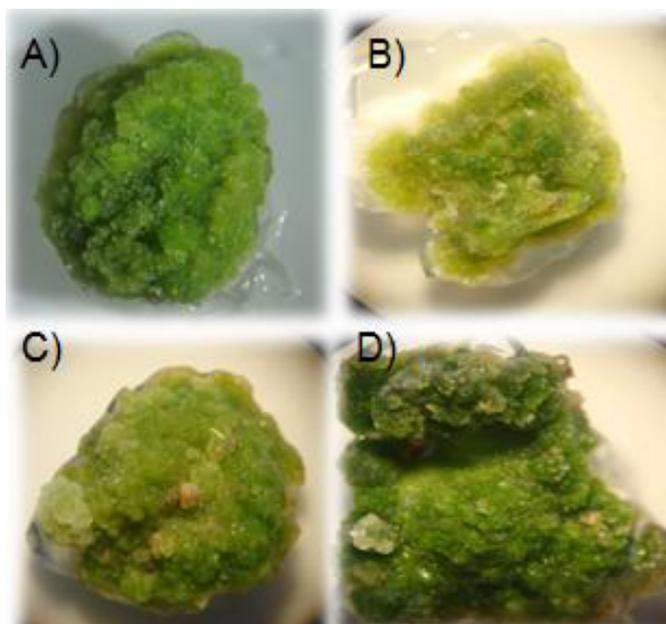


Figura 6. Efecto de las fitohormonas 2,4-D y 6BAP sobre la formación de callos en explante de hoja de las variedades de crisantemo: A) Godorniz (tratamiento 11); B) Holandesa (tratamiento 8); C) Moreliana (tratamiento 6) y D) Polaris white (tratamiento 5).

No obstante que se ha demostrado que la formación de callos puede provenir de diferentes tejidos como: tallos, hojas, secciones de hipocótilos, pétalos, meristemos apicales, ovarios, embriones cigóticos, tubérculos y filamentos de antera, por la totipotencialidad de las células vegetales (Holst *et al.*, 1996), es necesario suplementar al medio de cultivo con la apropiada concentración de auxinas capaz de inducir la formación de las masas proembriogénicas (callos), dicha concentración varía con el cultivo y entre variedades (Pérez *et al.*, 1998).

Es importante destacar que cada tipo de explante utilizado en este trabajo en crisantemo respondió de manera diferencial en relación al tiempo que tardaron en formar callo así como a la dosis de fitohormonas en el medio. Referente al tiempo, el explante de tallo fue el adecuado en las cuatro variedades de crisantemo evaluadas. En otras investigaciones como la de Seetharam y colaboradores

(2000), regeneraron a través del cultivo de explantes de tallo 19 de 37 variedades de crisantemo con diferentes respuestas entre ellos, a lo que Ávila y colaboradores (1998) indican que esta variable es una característica ligada al genotipo.

Los resultados de las cuatro variedades de crisantemo evaluadas en este trabajo demostraron que si hay respuesta diferencial en la calidad de callos (porcentaje de formación de callo, peso y friabilidad) dependiendo de la fuente de explante y la concentración del balance hormonal auxina/citocinina empleada. Destacando que para el caso de las variedades de crisantemo la relación de 1:1 de 2,4-D y 6BAP, es la más eficiente para la inducción de callos.

Parte de la información de este apartado fue aceptada para su publicación en memorias en extenso en el VXI Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas “Producción y protección de cultivos: Bajo un escenario de cambio climático” con el título “Respuesta diferencial a la formación de callo de *Dendranthema grandiflora*” ISBN 978-0-9911261-0-1, llevado a cabo en el año 2013, en la Ciudad de Mexicali, Baja California, México (Anexo 6).

7.3. Inducción de embriones somáticos.

Se eligieron los callos de mayor peso y que no eran friables para realizar los tratamientos de inducción de embriones somáticos, provenientes de explante de tallo (Fig. 7). Para la variedad Godorniz se utilizaron los callos provenientes del tratamiento con 1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.3 mg L⁻¹ de 6BAP, para Holandesa callos del tratamiento con 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.1 mg L⁻¹ de 6BAP; y para Polaris white callos provenientes del tratamiento con 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.3 mg L⁻¹ de 6BAP. Los callos se expusieron a tratamientos de TDZ o 6BAP (12 callos por tratamiento). Para la observación y conteo de los embriones se utilizó un microscopio estereoscópico.

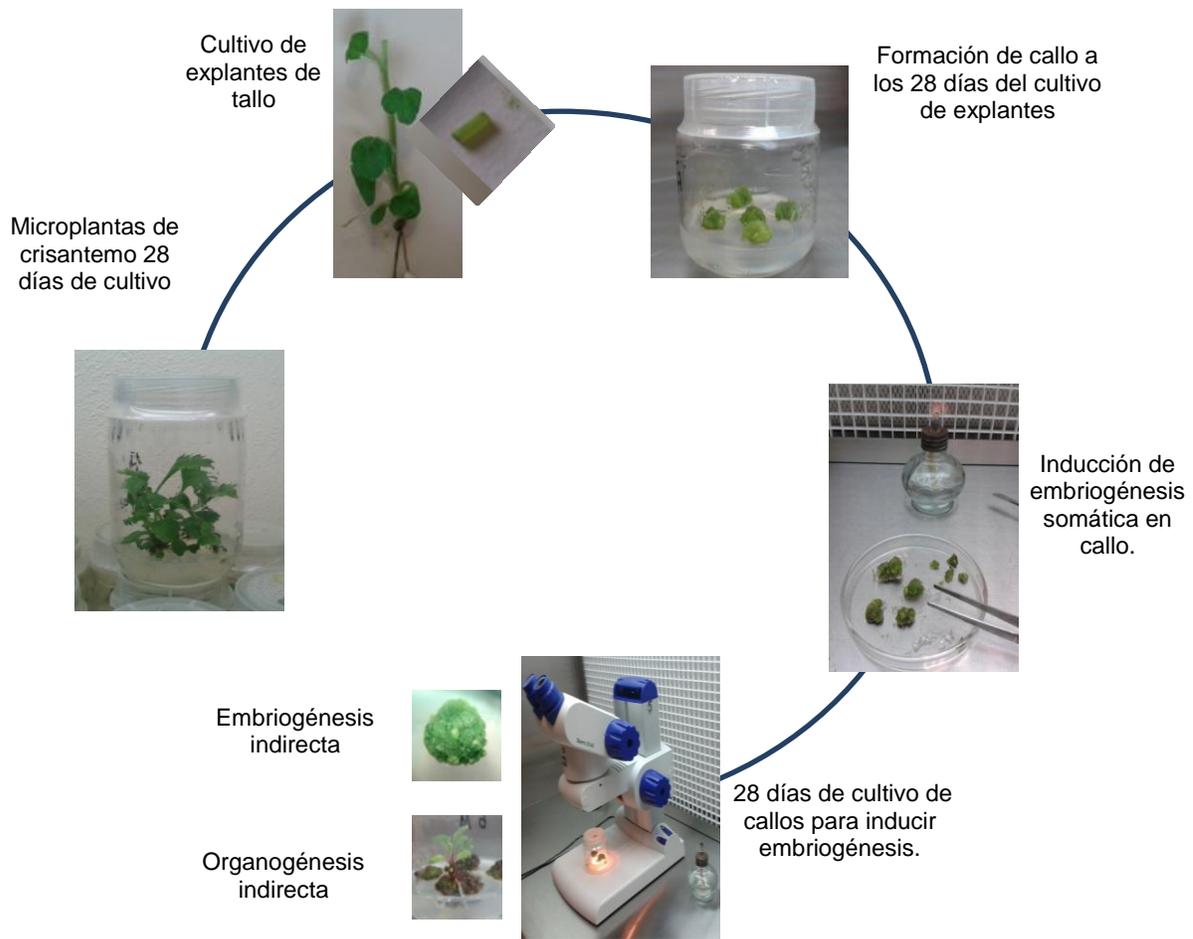


Figura 7. Esquematación de la inducción de embriogénesis y organogénesis de las variedades de crisantemo: Godorniz, Holandesa y Polaris white.

Los callos de la variedad Moreliana no se llevaron a embriogénesis, debido a que los callos formaron organogénesis directa, en la etapa de inducción de callo en todos los tratamientos (Fig. 8), obteniéndose en promedio 3.6 brotes por callo. Pérez (1987; en Pérez *et al.*, 1998), menciona que la organogénesis a partir de callos depende del tipo de concentración de las fitohormonas empleadas. Santalla y colaboradores (1998), reportan que las citocininas inducen organogénesis en cultivo de tejidos en presencia de una auxina, en nuestra investigación se utilizó como citocinina 6BAP y como auxina la 2,4-D, la combinación en la que se obtuvo

mayor número de brotes fue en el tratamiento de 6BAP 0.3 mg L⁻¹ y de 2,4-D 0.3 mg L⁻¹, en otros trabajos (Valle-Sandoval *et al.*, 2008), se ha inducido organogénesis usando 6BAP y como auxina AIA, reportando que para la variedad de crisantemo Texana e Indianápolis, se necesita una relación de 6BAP y AIA cercana a 2:1 para lograr la emisión de brotes sobre los callos, la mejor combinación que lograron fue utilizando 3.0 mg L⁻¹ de 6BAP y 1.8 mg L⁻¹ de AIA.



Figura 8. Organogénesis directa en la variedad Moreliana, tratamiento con 0.3 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.3 mg L⁻¹ de 6BAP, 28 días de cultivo.

Cabe destacar que esta respuesta encontrada en la variedad Moreliana y que no fue observada en las otras tres variedades de crisantemo reitera, la respuesta diferencial que existe aún entre variedades de la misma especie, por lo que es necesario que en trabajos de biotecnología que incluyan organogénesis y embriogénesis se prueben diferentes fitohormonas, dosis y tipos de explantes.

A los 28 días del cultivo de los callos en medio adicionado con las fitohormonas 6BAP o TDZ, se contabilizaron los embriones formados sobre los callos (Anexo 5), a la segunda semana del cultivo se observó la formación de embriones somáticos, en las tres variedades de crisantemo.

A los 28 días del cultivo se observaron brotes en los callos de las variedades Godorniz y Holandesa con los tratamientos de TDZ 0.1 y 1.0 mg L⁻¹, dichos brotes tuvieron una altura promedio de 0.5 cm (Fig. 9).



Figura 9. Brote de la variedad Holandesa de 28 días de cultivo con el tratamiento 6BAP 0.1 mg L⁻¹.

En el tratamiento de TDZ 1.0 mg L⁻¹, la variedad Holandesa presentó oxidación en promedio en un 25% de cada callo (Fig. 10). Se ha reportado, que la oxidación se produce por un desbalance entre las reacciones de los mecanismos antioxidantes, causado por un incremento de radicales libres (Turrens, 2003), que pueden conllevar a una destrucción oxidativa de la célula (Mittler *et al.*, 2004).



Figura 10. Oxidación de callos de la variedad Holandesa del tratamiento TDZ 1.0 mg L⁻¹ a los 28 días de cultivo.

Entre los seis tratamientos empleados para inducir embriogénesis hubo diferencias en el número de embriones formados en las tres variedades (Fig. 11). Los callos de la variedad Godorniz formaron más embriones en los seis tratamientos probados y la variedad Polaris white fue la que presentó menos número de embriones.

De manera general los tratamientos de 6BAP 3.0 mg L⁻¹ y TDZ 1.0 mg L⁻¹ son los que inducen el mayor número de embriones en las tres variedades (Cuadro 7).

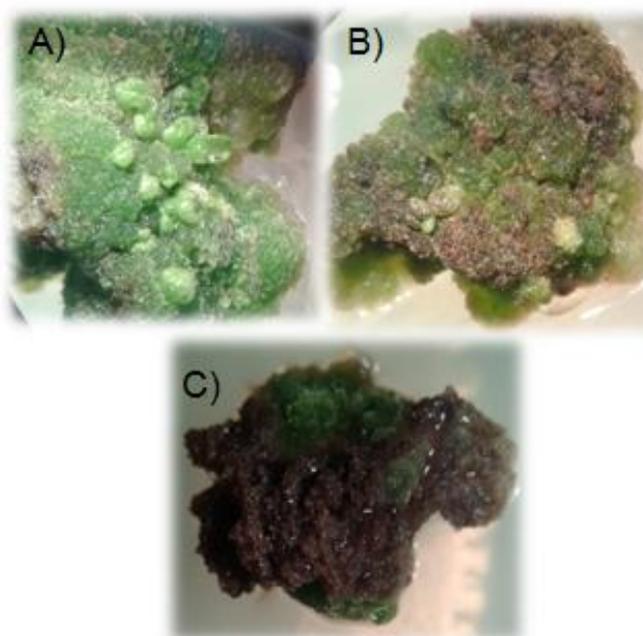


Figura 11. Embriones formados en callos de las variedades: A) Godorniz tratamiento de TDZ 1.0 mg L⁻¹; B) Holandesa tratamiento 6BAP 3.0 mg L⁻¹ y C) Polaris white tratamiento TDZ 1.0 mg L⁻¹.

Cuadro 7. Efecto del 6BAP o del TDZ sobre la formación de embriones somáticos formados en seis tratamientos de tres variedades de crisantemo.

Variedad	Tratamientos					
	6BAP	6BAP	6BAP	TDZ	TDZ	TDZ
	0.1 mg L ⁻¹	1.0 mg L ⁻¹	3.0 mg L ⁻¹	0.1 mg L ⁻¹	1.0 mg L ⁻¹	3.0 mg L ⁻¹
Godorniz	2	5	6	1	7	5
Holandesa	1	2	4	2	3	2
Polaris white	1	1	2	0	2	0

Los resultados son el promedio de 12 callos por tratamiento.

En los tratamientos que formaron embriones somáticos, se pudieron observar embriones en estado globular, corazón, torpedo y cotiledonar (Fig. 12), en los tratamientos de TDZ 0.1 y 1.0 mg L⁻¹ de los callos de la variedad Godorniz solo se observaron embriones en estado globular.

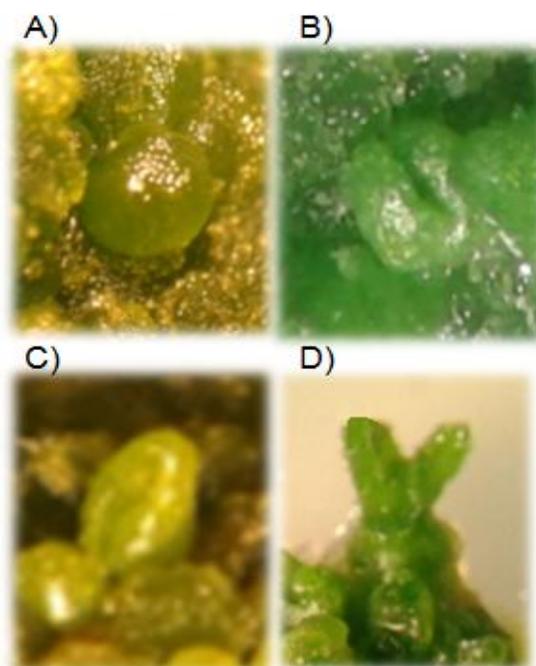


Figura 12. Estadios de los embriones somáticos de crisantemo variedad Holandesa: A) Globular; B) Corazón; C) Torpedo y D) Cotiledonar.

Existen investigaciones como la de Gómez y colaboradores (2006), en la que externamente no se pudo diferenciar los estados de corazón, torpedo y cotiledonar de la formación de embriones, también menciona que algunos autores describen el desarrollo de todos los estados del desarrollo del embrión somático y otros solo describen formación de estados globulares, ellos concluyen que la forma y secuencia de aplicación de los tratamientos inductores también originan las diferencias señaladas.

Cabe destacar que todos los brotes que crecieron sobre los callos de los seis tratamientos para inducir embriones somáticos de las variedades; Godorniz y Holandesa, incluyendo la variedad Moreliana que generó organogénesis, fueron subcultivados en medio MS (Fig. 13), para evaluar si estos brotes eran viables.

Se encontró que a las 2 semanas del subcultivo, los brotes ya tenían sistema radical formado (Fig. 13), por lo que estas plantas son potencialmente viables para evaluarlas en invernadero. Por su parte Hodson de Jaramillo y colaboradores (2008), mencionan que el 85% de los brotes obtenidos a partir de organogénesis de crisantemo de las variedades White albatross, Yellow albatross y Escapade presentaron enraizamiento espontáneo, sin necesidad de adicionar fitohormonas. La respuesta diferencial entre las variedades de crisantemo evaluadas no solo se presentó en el tipo de explante y concentración hormonal utilizada, también se encontró diferencia entre la inducción de organogénesis directa encontrada en Moreliana y organogénesis indirecta de la variedad Holandesa y Godorniz, mientras que Polaris white formó solo embriones.

Cabe destacar que las condiciones de desarrollo fueron bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Condiciones reportadas por Ayala (2010), para la inducción de la respuesta embriogénica en *Agave atrovirens*.

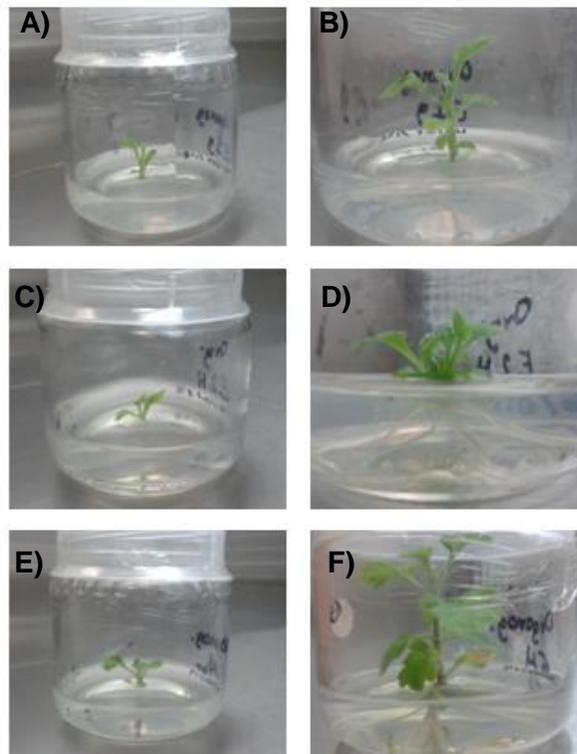


Figura 13. Subcultivo de brotes indirectos a medio MS de las variedades de crisantemo: A) Godorniz tratamiento de 6BAP 0.1 mg L⁻¹; B) Holandesa tratamiento de 6BAP 1.0 mg L⁻¹ y C) Moreliana tratamiento de 2,4-D 0.3 mg L⁻¹ y 6BAP 0.3 mg L⁻¹. Brotes de 2 semanas de subcultivo de las variedades de crisantemo D) Godorniz; E) Holandesa y F) Moreliana.

VIII. CONCLUSIONES

1. Existe una respuesta diferencial en la inducción de formación de callo, organogénesis directa e indirecta y la formación de embriones somáticos dependiendo de la combinación de fitohormonas, tipo de explante y la variedad de crisantemo.
2. Los callos formados de explante de tallo son los óptimos ya que no presentan friabilidad y tienen mayor peso en menor tiempo.
3. El explante de hoja tardo más tiempo en formar callo, sin embargo, el peso y porcentaje de formación fue mayor comparado con los explantes de tallo y raíz.
4. La variedad Moreliana responde con organogénesis somática directa y la variedad Godorniz y Holandesa con embriogénesis y organogénesis somática indirecta; mientras que la variedad Polaris white solo formó embriones somáticos.
5. Los brotes originados por organogénesis directa e indirecta se establecieron adecuadamente a condiciones *in vitro*.

IX. RECOMENDACIÓN

Es importante que las microplantas generadas de embriogénesis u organogénesis somática de las cuatro variedades de crisantemo utilizadas en este trabajo, puedan ser evaluadas en condiciones *in vitro* y posterior en condiciones de invernadero para evaluar las características.

Los embriones obtenidos pueden ser tratados con radiación para inducir variabilidad.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, P.J.C.; Castaño, P.H.; Corrales, G.L.L.; Jiménez, R.S.L. y Díaz, C.A. 2006. Evaluación de algunas combinaciones de reguladores de crecimiento inductoras de callos en Achiote (*Bixa orellana* L.), planta activa contra la mordedura de serpientes. VITAE Revista de Química Farmacéutica 13(1): 17-23.
- Arboleda, J. 2008. Floricultura, negocio rentable. Info rural. [En línea]. Disponible en <http://www.inforural.com.mx/spip.php?article27127> (Consultado el 30 de agosto de 2012).
- Atree and Fowke, 1991 In: Ojeda, Z.M. 1996. Inducción de organogénesis y embriogénesis somática en *Pinus cembroides* (Zucc) y *Pinus halepensis* Mill. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México. p. 58.
- Ávila, A.; Pereyra, S.M. and Arguello, J.A. 1998. Nitrogen concentration and proportion of NH₄-N affected cultivar response in solid and liquid media. Horticultural Science 33: 336-338.
- Ayala, G.L.M. 2010. Inducción de embriogénesis somática en cultivo *in vitro* de *Agave atrovirens* Karw. Ex salm dyck. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. p. 88.
- Barrera, O.A.; Cabrera, R.J.; García, P.F.; Alcántara, Ñ.J.C.; Sánchez, M.E.; Cruz, M.J. y Granada, C.L. 2007. Producción de Crisantemo (*Dendranthema spp.*) en Morelos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Folleto Técnico No. 27. p. 20.
- Boase, M.R.; Miller R. and Delores S.C. 1997. Chrysanthemum systematics, genetics and breeding. Plant Breeding Review 14: 480.
- Ceballos, G.; List, R.; Garduño, G.; López, C.R.; Muñozcano, Q.M.J.; Collado, E. y San Román, J. 2009. La diversidad biológica del Estado de México. Gobierno del Estado de México. p. 53.
- Chistianson, M.L. and Warnick, D.A. 1988. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. Horticultural Science 23(3): 515-519.

- Del Rivero-Bautista, N.; Agramonte-Peñalver, D.; Barbón-Rodríguez, R.; Camacho-Chiu, W.; Collado-López, R.; Jiménez-Terry, F.; Pérez-Peralta, M. y Gutiérrez-Martínez, O. 2008. Embriogénesis somática en (*Anthurium andraeanum* Lind.) variedad "Lambada". *Ra Ximhai* 4(1): 135-149.
- Espinoza N.O.; Estrada, R.; Silva-Rodríguez, D.; Tovar, P.; Lizarraga, R. and Dodds, J.H. 1986. The potato: a model crop plant for tissue culture. *Outlook on Agriculture* 15: 21-26.
- Espinoza, P.J.L. S/A. Fitomejoramiento y producción de semilla. Universidad Católica Agropecuaria del trópico seco. Nicaragua. p. 10.
- Fenner, J. y Gebauer, T. 1992. Las Flores de la Muerte. Ensayo sobre la floricultura mexicana. Ed. Grupo de Estudios Ambientales, A.C. México. p. 87.
- Finstad, K.; Brown, D.C. and Joy, K. 1993. Characterization of competence during induction of somatic embryogenesis in Alfalfa tissue culture. *Cell, Tissue and Organ Culture* 34: 125-132.
- Gómez, C.; Uribe, M.; Ríos, D. y Sánchez-Olate, M. 2006. Inducción de callo embriogénico en *Eucalyptus globulus* Labill. *Interciencia* 31(10): 734-738.
- González, E.A.; Cedillo, P.E. y Díaz, G.L. 2007. Morfología y anatomía de las plantas con flores. Universidad Autónoma de Chapingo. Texcoco, Estado de México, México. p. 276.
- Gutiérrez M.A., Santacruz R.F., Cabrera P.J.L. y Rodríguez G.B. 2003. Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. *Revista digital científica y tecnológica e-Gnosis*. 1(4): 0-19.
- Hernández, S.I. 2007. Regeneración clonal de alcornoques adultos (*Quercus suber* L.) mediante embriogénesis somática. Tesis de doctoral. Universidad de Alcalá. Madrid, España. p. 241.
- Hodson de Jaramillo, E.; Forero, A.; Cancino, G.; Moreno, A.M.; Monsalve, L.E. and Acero, W. 2008. *In vitro* regeneration of three chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*) varieties "via" organogenesis and somatic embryogenesis. *Universitas Scientiarum* 13(2): 118-127.

- Holst, G.; Mare, K.; Wiert, M.; Postman, H. and Abbestee, R. 1996. Somatic embryogenesis Method. United States Patent 5: 587,312.
- Hu, C.V and Wang, J.P. 1983. In: Pérez P.J.N.; Alvarado C.Y.; Gómez K.R.; Jiménez G.E.A. y Orellana P.P.A. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. p. 390.
- IAPT (International Association for Plant Taxonomy). 2011. Catalogue of life: 2011. Annual Checklist. Indexing the world's Known Species. [En línea]. Disponible en <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2011v1/search.php> (Consultado el 12 de septiembre de 2011).
- Kiplinger, L.N. 1969. Comercial flowercing. Mc Graw-Hill Book. New York, USA. 514 p.
- Litz, R.E. y Jarret, R.L. 1993. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis Somática y Organogénesis. In: Roca, W. y Mroginski, L. A. (Eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Cap. 7. CIAT. Colombia. p. 970.
- Litz, R.E.; Hemdrix, R.C.; Moon, P.A. and Chavez, V.M. 1998. Induction of embryogenic mango cultures as affected by genotype, explanting, 2,4-D and embryogenic nurse culture. *Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 13-18.
- Maheswaran, G. and Williams, E.G. 1986. Primary and secondary direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Brassica campestris*. *Journal of Plant Physiology* 124: 455-463.
- Manzanilla, R.M.A. 2004. Inducción de embriogénesis somática de tejido nucelar de tres variedades de mango (*Mangifera indica* L.). Tesis de maestría. Universidad de Colima. Tecmán, Colima, México. p. 117.
- Martínez, M.S. de J.; Gómez, K.R.; Posada, P.L.; Barbón, R.R.; Acosta, S.M.; Reyes, V.M.; Pérez, B.M.; Torres, R.D.; Pons, C.M.; La O, C.M.; Aguilera C.A. y Tejeda, G.M. 2012. Efecto de dos citoquininas, ácido ascórbico y sacarosa en la obtención de plantas *in vitro* de *Sorghum bicolor* para la formación de callos. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14(2): 101-110.
- Mata-Rosas, M.; Jiménez-Rodríguez, A. y Chávez-Ávila, V.M. 2006. Somatic Embryogenesis and Organogenesis in *Magnolia dealbata* Zucc. (Magnoliaceae),

an Endangered, Endemic Mexican Species. Horticultural Science 41(5): 1325-1329.

- Mithila, J.; Hall, J.C.; Victor, J.M. and Saxena. 2003. Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulina ionantha* Wendl.). Cell Biology and Morphogenesis 21: 408-414.
- Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M. and Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science 9(10): 490-498.
- Mora, H.M.E. 1991. Efecto del Ácido Acetil Salicílico en el crecimiento de Yemas axilares de *Solanum tuberosum* Cultivadas *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México. p. 114.
- Nomura, K. and Komamine, A. 1985. Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. Plant Physiology 79: 988-991.
- Orozco, H.M.E. y Mendoza M.M. 2003 competitividad local de la agricultura ornamental en México. Revista Científica Multidisciplinaria de la Universidad Autónoma del Estado de México 10(1): 29:42.
- Otahola-Gómez, V.; Aray, M. y Antoima, Y. 2001. Inducción de mutantes para el color de la flor en crisantemo (*Dendranthema grandiflora* (Ram.) Tzvelev) mediante radiaciones gamma. Revista UDO Agrícola 1(1): 56-63.
- Peña, R.Y.J. 2006. Curso de Biología. Unidad de Investigación en Biotecnología Vegetal. San Cristóbal de las casas, Chiapas, México. p. 23.
- Perea-Dallos, M. 1992. Sistemas "*in vitro*", un complemento en el mejoramiento de las musáceas. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 19(70): 323-332.
- Pérez P.J.N.; Alvarado C.Y.; Gómez K.R.; Jiménez G.E.A. y Orellana P.P.A. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. p. 390.

- Piovano, M.V.; Barssia, F. y Pisssi, G. 2011. Cultivo de Crisantemos en Mendoza. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. p. 4.
- Radice, S. 2010. Morfogénesis. In: Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E.; y Mroginski, L. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ed. INTA y ArgenBio Buenos Aires, Argentina. p. 648.
- Salisbury, F.B. y Ross, C.W. 1994. Fisiología Vegetal. Ed. Iberoamericana. In: Azcón-Bieto, J. y Talón, M. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ed. McGraw-Hill. España. p. 522.
- Sánchez, H.R.A. 2012. Obtención de plantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white libres de los virus TAV y TSWV empleando termoterapia *in vitro* y cultivo de yemas laterales. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Estado de México, México. p. 72.
- Santalla M.J.; Power J.B. and Davey, M.R. 1998. Efficient *in vitro* shoot regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. Euphytica 102: 195-202.
- Seabrook, J.E.A.; Douglass, L.K. and Tai, G.C.C. 2001. Segregation for somatic embryogenesis on stem-internode explants from potato seedlings. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 65: 69-73.
- Seetharam, A.; Rademaker, W.; Ramanna, M.; Udayakumar, M. and De Jong, J. 2000. Response of stem explants to screening and explant source as a basis for methodical advancing of regeneration protocols for chrysanthemum. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 62: 47-55.
- Smith, H. and Grierson, D. 1982. Determination and related Aspects of plant Development. In: The molecular Biology of Plant Development. Botanical Monographs 18: 517-526.
- Smith, M.K. and Drew, R.A. 1990. Growth and yield characteristics of dwarf off-types recovered from tissue-cultured bananas. Australian Journal of Experimental Agriculture 30: 575-578.
- Teixeira, S.J.A. 2003. Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. Biotechnology Advances 21: 715-766.

- Teixeira, S.J.A. and Fukai, S. 2003. Chrysanthemum organogenesis through thin cell layer technology and plant growth regulator control. *Asian Journal of Plant Sciences* 2: 505-514.
- Tisserat, B.; Esan, E. and Murashige, T. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. *Horticultural Reviews* 1: 1-78. In: Pérez P.J.N.; Alvarado C.Y.; Gómez K.R.; Jiménez G.E.A. y Orellana P.P.A. 1998. *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. p. 390.
- Tulecke, W. and McGranham, G. 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of *Juglans regia* L. *Plant Science Letters* 40: 57-63.
- Turrens, J. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology* 552(2): 335-344.
- Turrialba, C. 1987. *II Curso de cultivo de tejidos*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Costa Rica. p. 124.
- Valle-Sandoval, M.R.; Mascorro-Gallardo, J.O.; Gil-Vázquez e Iturriaga- de la Fuente, G. 2008. Regeneración directa *in vitro* del crisantemo, *Dendranthema X grandiflorum* Kitam, a partir de segmentos de tallo. *Universidad y Ciencia* 24(3): 219-227.
- Vázquez, G.L.M. 2006. Plantas ornamentales de México. Red de ornamentales. [En línea]. Disponible en <http://www.uaemex.mx/ornamentalesred/> (Consultado el 6 de agosto de 2013).
- Vences-Contreras, C.; Vázquez-García, L.M. y Hernández-Rodríguez, O.A. 2009. Regeneración *in vitro* de once cultivares de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) a partir de meristemos apicales. *Agronomía Mesoamericana* 20(2): 409-415.
- Vidales, F.I. 2002. Efectos de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana Mill*). Tesis doctoral. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México. p. 170.
- Viloria, B. 2009. Enraizamiento *in vitro* y aclimatación de *Lisianthus (Eustoma grandiflorum)*. Tesis de licenciatura. Facultad de Agrobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México. p. 53.

- Vuylsteke, D. and De Langhe, E. 1985. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. *Tropical Agriculture* 62(4): 323-328.
- Weaver, J.R. 1990 Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Ed. Trillas. Séptima reimpresión. p. 9- 40.
- Wetherell, D.F. 1984. Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 3: 221-227.
- Zimmerman, J.L. 1993. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell* 5: 1411-1423.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de soluciones madre del medio Murashige y Skoog (MS).

Concentración de los reactivos.			
Solución.	Fórmula	Cantidad.	Observaciones
Sulfato de magnesio	MgSO ₄	3.7 g de MgSO ₄ en 100 mL de agua destilada.	
Hierro	Na ₂ EDTA	0.75 g	*Se disuelven en 20 mL de agua destilada cada uno.
	Sulfato ferroso	0.55 g	*El EDTA se calienta para disolverse. *Después ambos se aforan a 100 mL.
Tiamina		40 mg en 100 mL de agua destilada.	
Inositol		1 g en 100 mL de agua.	
Pantotenato de calcio		100 mg en 100 mL de agua destilada.	Se debe congelar (de preferencia en pequeñas proporciones para facilitar su uso).
Glicina		10 mg en 100 mL de agua destilada.	

- Todas las soluciones se guardan a 4°C y de preferencia en envases de vidrio color ámbar.

Preparación de sales			
Sustancia	Fórmula	Cantidad para 1000 mL	Cantidad para 2000 mL
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	17.5 g	35 g
Nitrato de potasio	KNO ₃	20 g	40 g
Cloruro de calcio	CaCl ₂ 2H ₂ O	4.5 g	9 g
Fosfato de potasio	KH ₂ PO ₄	1.75 g	3.5 g
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	50 mg	100 mg
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ 4H ₂ O	200 mg	400 mg
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ 7H ₂ O	100 mg	200 mg
Yoduro de potasio	KI	10 mg	20 mg
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	2.5 mg	5 mg
Sulfato cúprico 5.0 mg	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.5 mL de la solución preparada.	1 mL de la solución preparada.
Cloruro de cobalto 5.0 mg	CuCl ₂ 6H ₂ O		

*mg (miligramos).

NOTA: De estas dos últimas sustancias se pesan 5 mg de cada una y se disuelven en agua destilada, se aforan a 10 mL y se toma 1 mL para preparar 2 Litros y 0.5 mL para 1 litro.

Anexo 2. Preparación de medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).

Solución		Para 1000 mL		Para 500 mL	
Sales		100 mL		50 mL	
Sulfato de magnesio (Mg SO ₄)		10 mL		5 mL	
Inositol		10 mL		5 mL	
Hierro (Fe)		5 mL		2.5 mL	
Tiamina		1 mL		0.5 mL	
Pantotenato de calcio		2 mL		1 mL	
Glicina		0.5 mL		0.25 mL	
Azúcar		30 g		15 g	
Agar	Agar – agar	6.0 g		3.0 g	
	Agar bacteriológico	7.5 g		3.75 g	
	Fita gel	Cloruro de magnesio	2.35 g	0.5 mL	1.175 g

Para la realización del medio de cultivo se siguen los siguientes pasos:

- Se mezclan todas las soluciones (líquidos) en un recipiente con agua destilada.
 - Nota: el pantotenato de calcio se descongela antes de usarlo.
- Posteriormente se agrega el azúcar, dejando agitar hasta que la solución se vea homogénea.
- Se afora la solución a la cantidad requerida.
- Se mide el pH llevando la solución a 5.6-5.7
 - Nota: utilizar hidróxido de potasio (KOH) para subirlo y ácido clorhídrico (HCl) para bajarlo.
- Se agrega el agar y se tapa con clean pack.
- Se calienta la solución para homogenizar el agar.
- Finalmente se sirve en los frascos o tubos a utilizar.

Anexo 3. Peso total (mg) de 12 callos por cada tratamiento de las cuatro variedades de crisantemo.

t1	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	2035	0	0
Holandesa	1910	135	1683
Moreliana	3005	0	0
Polaris white	2110	0	158

t2	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	1018	0	0
Holandesa	901	0	1405
Moreliana	1185	0	388
Polaris white	1989	321	876

t3	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	2813	0	0
Holandesa	1204	0	1524
Moreliana	4190	0	0
Polaris white	2185	1384	1399

t4	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	2181	0	0
Holandesa	885	0	1679
Moreliana	2058	0	0
Polaris white	509	0	350

t5	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	6738	0	768
Holandesa	2085	84	1599
Moreliana	5591	395	1419
Polaris white	4517	453	1030

t6	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	6983	246	918
Holandesa	2006	50	620
Moreliana	4270	676	810
Polaris white	4670	521	619

t7	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	5811	108	972
Holandesa	2727	118	536
Moreliana	7045	380	1173
Polaris white	4645	0	872

t8	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	5776	152	582
Holandesa	2200	102	1198
Moreliana	4875	181	1024
Polaris white	2623	0	535

t9	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	4206	260	683
Holandesa	4153	104	612
Moreliana	3618	206	1405
Polaris white	2818	105	716

t10	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	4435	104	920
Holandesa	4310	146	710
Moreliana	4824	360	965
Polaris white	3866	97	421

t11	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	4008	83	488
Holandesa	4371	75	599
Moreliana	4019	123	832
Polaris white	3026	181	246

t12	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	1660	32	26
Holandesa	1734	53	33
Moreliana	2648	45	37
Polaris white	1660	0	19

t13	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	6342	129	476
Holandesa	6296	297	960
Moreliana	5964	444	1143
Polaris white	4837	240	813

t14	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	3654	54	574
Holandesa	5828	68	452
Moreliana	5430	285	395
Polaris white	4511	93	377

t15	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	4230	71	404
Holandesa	6300	136	1109
Moreliana	10215	335	871
Polaris white	4388	165	303

t16	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	2264	43	138
Holandesa	9458	54	334
Moreliana	5675	148	712
Polaris white	2145	67	411

Anexo 4. Porcentaje (%) de formación de callo por cada tratamiento de las cuatro variedades de crisantemo.

t1	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	100	0	0
Holandesa	100	50	100
Moreliana	100	0	0
Polaris white	100	0	50

t2	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	100	0	0
Holandesa	100	0	100
Moreliana	100	0	25
Polaris white	100	25	100

t3	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	100	0	0
Holandesa	100	0	100
Moreliana	100	0	0
Polaris white	100	100	100

t4	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	100	0	0
Holandesa	100	0	100
Moreliana	100	0	0
Polaris white	100	0	37.5

t5	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	100	100	100
Holandesa	100	100	100
Moreliana	100	87.5	100
Polaris white	100	75	75

t6	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	100	100	100
Holandesa	100	37.5	100
Moreliana	100	100	100
Polaris white	100	87.5	100

t7	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	100	50	100
Holandesa	100	75	75
Moreliana	100	100	100
Polaris white	100	100	100

t8	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	100	62.5	100
Holandesa	100	87.5	100
Moreliana	100	100	100
Polaris white	100	87.5	100

t9	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	100	75	100
Holandesa	100	100	100
Moreliana	87.5	100	100
Polaris white	100	100	100

t10	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	100	87.5	100
Holandesa	100	75	100
Moreliana	100	100	75
Polaris white	100	100	100

t11	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	100	75	75
Holandesa	100	100	75
Moreliana	100	100	100
Polaris white	100	100	100

t12	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	100	87.5	100
Holandesa	100	100	75
Moreliana	100	100	100
Polaris white	100	75	50

t13	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	100	87.5	87.5
Holandesa	100	100	100
Moreliana	100	100	100
Polaris white	87.5	100	100

t14	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	100	100	100
Holandesa	100	100	100
Moreliana	100	87.5	100
Polaris white	100	100	87.5

t15	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	100	75	100
Holandesa	100	87.5	100
Moreliana	100	100	100
Polaris white	100	87.5	100

t16	Hoja	Raíz	Tallo
Godorniz	100	100	100
Holandesa	100	100	100
Moreliana	100	87.5	100
Polaris white	100	87.5	100

Anexo 5. Número de embriones somáticos formados en cada tratamiento.

- Cada tratamiento estuvo conformado por 12 callos.

6BAP	0.1 mg L⁻¹	1.0 mg L⁻¹	3.0 mg L⁻¹
Godorniz	25	61	73
Holandesa	16	23	42
Polaris white	8	14	22

TZD	0.1 mg L⁻¹	1.0 mg L⁻¹	3.0 mg L⁻¹
Godorniz	16	86	65
Holandesa	24	34	18
Polaris white	3	27	5

Anexo 6. Resumen en extenso del XVI Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas “Producción y protección de cultivos: Bajo un escenario de cambio climático”.



XVI CONGRESO INTERNACIONAL EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

SIMPOSIO: *PRODUCCIÓN DE CULTIVOS EN INVERNADERO Y CAMPO BAJO CONDICIONES DE ZONAS ÁRIDAS*

SIMPOSIO: *ALTERNATIVAS BIOTECNOLÓGICAS PARA EL CONTROL DE PATOGENOS DEL SUELO*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Instituto de Ciencias Agrícolas



**XVI CONGRESO INTERNACIONAL EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

MEMORIAS Mexicali Baja

California México

24 y 25 de octubre del 2013

ISBN 978-0-9911261-0-1

RESPUESTA DIFERENCIAL A LA FORMACIÓN DE CALLO DE *Dendranthema grandiflora*.Gómora Rasso, Janet¹; Mora Herrera, Martha Elena¹; García Velasco, Rómulo¹ y López Delgado, Humberto².¹Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México. Km 1.5, carretera Tenancingo-Villa Guerrero, Estado de México, C.P. 52400, México. E-mail: marthaelenam@gmail.com²Programa Nacional de Papa, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), SEDAGRO Metepec, Estado de México, C.P. 52140, México.

Resumen

En México, el crisantemo es uno de los principales cultivos florícolas de gran demanda en el mercado. El uso de material mejorado es importado de otros países, lo que provoca elevados costos para adquirir las plantas, además, de que requieren prácticas culturales altamente dependientes de agroquímicos para adaptarse a las nuevas condiciones del medio, de ahí la importancia de generar variedades en las regiones donde se cultivan. La formación de callo se utiliza dentro de la biotecnología como un método para regenerar variabilidad en condiciones *in vitro* que incluye embriogénesis y organogénesis somática. La inducción de callo se realizó a partir de explantes provenientes de hoja, raíz y tallo de las variedades: Godorniz, Holandesa, Moreliana y Polaris white. El experimento estuvo conformado por 13 tratamientos con la aplicación de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, se utilizó BAP y 2,4-D a diferentes concentraciones, los explantes se evaluaron a los 28 días del cultivo. El explante de tallo presentó formación óptima de callo en las 4 variedades evaluadas, aunque los explantes de raíz también presentaron alto porcentaje de formación de callo estos eran friables. La obtención de callo a partir de explantes de hoja se presentó hasta los 56 días de cultivo, sin embargo, el peso registrado de estos callos fue mayor a los callos formados por explantes de tallo.

Palabras clave: *in vitro*, 2,4-D, *Crisantemo*.

Abstract

In Mexico, the chrysanthemum is a of the major floriculture crops of high demand en the market. The use of improved material is imported of other countries, this causes high costs for acquire the plants, also, this need cultural practices highly dependent of agrochemical for adapt to new environmental conditions, hence the importance of generate varieties in the regions where are cultivate. The forming of callus is used within of the biotecnology as a method for regenerate variability in conditions *in vitro* that includes organogenesis and somatic embryogenesis. The induction of callus was performed from explants of leaf, root and stem of the cultivars: Godorniz, Holandesa, Moreliana y Polaris white. The experiment was composed by 13 treatments with the application of growth regulators in the medium of culture, was used BAP and 2,4-D in different concentrations, the explants were evaluated at 28 days of cultivation. The explants of stem presented optimal training of callus en the 4 varieties evaluated, although the explants of root also showed high percentage of formation of callus but these were friables. The obtaining of callus from leaf was showed to 56 days of cultivation, however, the weight recorded of these calluses was greater than los calluses of explants formed of stem.

Keywords: *in vitro*, 2,4-D, *Chrysanthemum*.

Introducción

El crisantemo ocupa el tercer lugar de importancia económica (Orozco y Mendoza, 2003) y se encuentra entre los tres cultivos ornamentales más importantes a nivel mundial, con gran valor económico y cultural (Boase *et al.*, 1997). Los problemas más comunes a los que se enfrentan los productores de crisantemo es conseguir las plántulas de las variedades más requeridas en el mercado y la sanidad del material (Piovano *et al.*, 2011). La mejora para la obtención de híbridos comerciales se basa en la forma y el color, resistencia a plagas y enfermedades, así como en su adaptación para la producción de flores todo el año, incidiendo siempre en la calidad (Barrera *et al.*, 2007). México se ha caracterizado por ser un país que utiliza sus recursos genéticos ornamentales; no obstante existen especies mexicanas que se les ha realizado mejoramiento genético fuera de nuestro territorio, reingresando a nuestra horticultura ornamental en forma de nuevas variedades, con gran valor comercial, ejemplo de ello son especies de las familias de cactáceas, orquídeas, agaváceas, euforbiáceas, asteráceas, bromeliáceas, aráceas, entre otras (Vázquez, 2006). El empleo de los métodos tradicionales de mejora genética está limitado por varios factores, entre ellos; los largos periodos de selección mediante marcadores morfológicos, la complejidad del carácter a mejorar y la influencia del medio ambiente (Martínez *et al.*, 2012). El mejoramiento de variedades de plantas está más bien desligado del proceso general de la producción agrícola y se realiza mediante la utilización de los métodos de selección hasta los de transformación genética, con el surgimiento de las técnicas biotecnológicas que permiten manejar *in vitro* órganos, tejidos y células (Pérez *et al.*, 1998).

La embriogénesis y organogénesis somática ha tenido un gran desarrollo en los últimos años y está ampliamente considerada como la mejor modalidad de regeneración basada en técnicas de cultivo de tejidos vegetales (Hernández, 2007). La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos, la característica más distintiva de un embrión somático es que constituye un nuevo individuo con estructura bipolar capaz de originar una planta completa, existen dos tipos de embriogénesis somática, la directa y la indirecta, en la primera los embriones aparecen directamente sobre el explante, en la segunda es indispensable obtener un tejido calloso o bien, una suspensión celular embriogénica (Pérez *et al.*, 1998). Las hormonas y reguladores de crecimiento son compuestos que en inhiben o modifican de alguna forma cualquier proceso fisiológico vegetal, se sintetizan en alguna parte de la planta y se traslocan a otra, en donde concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica, que promueve diferentes tipos de crecimiento (Vidales, 2002). Hodson *et al.* (2008), reportaron la presencia de tejidos indiferenciados como una característica común donde la citocinina BAP ha estimulado la producción de callos. Aunque, el empleo de auxinas son la mejor manera de inducir la formación de células somáticas (Pérez *et al.*, 1998). El objetivo de este trabajo fue conocer la respuesta diferencial a la formación de callo de 4 variedades de *Dendranthema grandiflora* (crisantemo) como parte del protocolo de embriogénesis y organogénesis para crisantemo.

Materiales y Métodos

La investigación se realizó en el laboratorio de investigación de Fisiología y Biotecnología vegetal del Centro Universitario UAEM Tenancingo, Estado de México. Las plantas de crisantemo variedad Godorniz, Holandesa, Moreliana y Polaris white, que fueron colectadas de un invernadero de producción florícola en la localidad de Zacango la Baja, municipio de Villa Guerrero, Estado de México.

Inclusión de yemas a condiciones *in vitro*

Segmentos de ~0.5 mm con una yema, se esterilizaron con detergente (Roma®), se enjuagaron con agua destilada estéril. Después se lavaron con etanol al 70% (v/v) y se enjuagaron. Posteriormente se pasaron a cloro (Clorox®) al 30% (v/v) agregando 0.5 mL de Tween 20, durante 15 min, después se enjuagaron con agua destilada estéril. Se cultivaron en medio básico Murashige y Skoog (MS, Murashige y Skoog, 1962) sin fitohormonas. El material de laboratorio que se utilizó en la micropropagación (cajas petri, pinzas y bisturí) y el medio de cultivo se esterilizaron durante 20 min en una autoclave, a una temperatura de

Producción y protección de cultivos Bajo un escenario de cambio climático

120°C. Después de 28 días los esquejes desarrollados y sin contaminación sirvieron como fuente de explantes para los experimentos.

Inducción de callos

Segmentos de tallo, raíz u hoja, de cada variedad, se cultivaron en medio MS, adicionado con la fitohormona citocinina, Bencil Amino Purina (BAP) y la auxina, ácido 2,4-dichlorofenoxiacético (2,4-D), en las concentraciones indicadas en el cuadro 1. Los explantes de tallo y raíz se cortaron en segmentos de aproximadamente 0.3 cm de longitud, provocando pequeñas incisiones en estos. A la hoja se le quitaron los márgenes y los explantes se cortaron de aproximadamente 0.3 cm, estos contenían parte de la nervadura principal.

Cuadro 1. Concentración de fitohormonas en cada tratamiento del experimento para inducir callo. El experimento estuvo conformado por 17 tratamientos

	2,4-D (mg L ⁻¹)				
	0.0	0.1	0.3	1.0	3.0
BAP	0.1	t2	t3	t4	t5
(mg L ⁻¹)	0.3	t6	t7	t8	t9
	1.0	t10	t11	t12	t13

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de formación de callo, peso y friabilidad. El diseño experimental fue de bloques al azar con 8 explantes por tratamiento y el análisis estadístico ANOVA ($P \leq 0.05$).

Resultados y discusión

Formación de callos

A los 28 días del cultivo de los diferentes explantes, se realizó la evaluación del porcentaje de formación, peso y friabilidad de callos en las 4 variedades de crisantemo. El explante de tallo fue el que presentó mayor porcentaje de formación de callo en todos los tratamientos para las 4 variedades con respecto a raíz y hoja. Además estos callos no presentaron friabilidad (Figura 1). Los resultados muestran que si hay respuesta diferencial entre tratamiento hormonal y tipo de explante entre las variedades, así, los callos formados de tallo de Holandesa tienen mayor peso que las otras variedades. Es importante destacar que en los tratamientos del 7 al 12 hubo mayor respuesta de callo. En los tratamientos del 2 al 5, Moreliana y Godorniz no formaron callo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Peso promedio (mg) de callos de los 13 tratamientos de los explantes de tallo en las 4 variedades de crisantemo.

Tratamientos	Variedad			
	Godorniz	Holandesa	Moreliana	Polaris white
1	0	0	0	0
2	0	210.4 ^{A*}	0	39.5 ^B
3	0	175.6 ^{A*}	194.0 ^A	109.5 ^{B*}
4	0	190.5 ^{A*}	0	174.9 ^{A*}
5	0	209.9 ^{A*}	0	116.7 ^B
Peso en mg	6	96.0 ^{B*}	199.9 ^A	177.4 ^{A*}
	7	114.8 ^{A*}	0	101.3 ^{A*}
	8	121.5 ^{B*}	89.3 ^C	146.6 ^A
	9	72.8 ^{B*}	149.8 ^{A*}	128.0 ^{A*}
	10	85.4 ^{B*}	76.5 ^{B*}	175.6 ^{A*}
	11	115.0 ^{B*}	88.8 ^{C*}	160.8 ^A
	12	81.3 ^B	99.8 ^A	104.0 ^{A*}
	13	0	5.5 ^B	4.6 ^B
				19.0 ^A

Producción y protección de cultivos Bajo un escenario de cambio climático

*Tratamiento con 100% de formación de callos. Los resultados son el promedio de 8 plantas por tratamiento. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tuckey, $P < 0.05$).

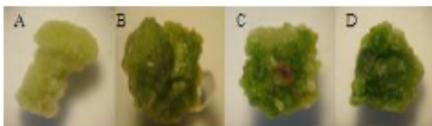


Figura 1. Efecto de combinación de los reguladores de crecimiento 2,4-D y BAP sobre el crecimiento de los callos: A callo de la variedad Godorniz (t8), B callo de la variedad Holandesa (t2), callo de la variedad Moreliana (t3), D Callo de explante de raíz de Polaris white (t4)

En el explante de raíz hubo formación de callo en los tratamientos del 6 al 13, con el 100% de formación de callo en Moreliana (Cuadro 3). Sin embargo, los callos formados de explante de raíz fueron 100% friables (Fig. 2), a excepción de los callos de la variedad Holandesa en el tratamiento 2. Los callos de explante de raíz también presentaron menor peso que los de tallo.

Cuadro 3. Peso promedio (mg) de callos de los 13 tratamientos de los explantes de raíz en las 4 variedades de crisantemo.

Tratamientos	Variedad			
	Godorniz	Holandesa	Moreliana	Polaris white
1	0	0	0	0
2	0	33.8	0	0
3	0	0	0	160.5
4	0	0	0	346*
5	0	0	0	0
Peso en mg	6	10.5 ^{C*}	56.4 ^B	75.5 ^A
	7	30.8 ^{B*}	16.7 ^C	84.5 ^{A*}
	8	27.0 ^B	19.7 ^B	47.5 ^{A*}
	9	30.4 ^A	14.6 ^B	22.6 ^{A*}
	10	43.3 ^A	13.0 ^{*C}	25.8 ^{*B}
	11	14.9 ^C	24.3 ^B	45.0 ^{A*}
	12	13.8 ^B	9.4 ^{B*}	15.4 ^{AB*}
	13	0	6.6 ^{A*}	5.6 ^{A*}

*Tratamiento con 100% de formación de callo. Los resultados son el promedio de 8 plantas por tratamiento. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tuckey, $P < 0.05$).



Figura 2. Efecto de combinación de los reguladores de crecimiento 2,4-D y BAP sobre la friabilidad y crecimiento de los callos: A callo friable de Godorniz (t6), B callo friable de Holandesa (t9), callo friable de Moreliana (t12), D Callo friable de explante de raíz de Polaris white (t3).

En el explante de hoja la formación de callo se observó hasta los 56 días de cultivo en un 100% en las 4 variedades. Siendo Godorniz y Moreliana las que tuvieron mayor peso promedio en los callos con 100% de callos no friables (Figura 3)

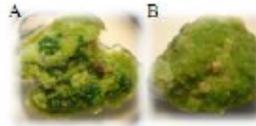


Figura 3. Efecto de combinación de los reguladores de crecimiento 2,4-D y BAP la formación de callos en explantes de hoja: A callo de Godorniz (t6), B callo de Moreliana (t6).

Aunque se ha demostrado que la formación de callos puede provenir de diferentes tejidos como: tallos, hojas, secciones de hipocótilos, pétalos, meristemos apicales, ovarios, embriones cigóticos, tubérculos y filamentos de antera, por la totipotencialidad de las células vegetales (Holst *et al.*, 1996). Nuestros resultados demuestran que si hay respuesta diferencial en la calidad de callos dependiendo la fuente de explante, referente a tiempo, el explante de tallo es el mejor en el caso de crisantemo, sin embargo, el de hoja aunque tarda más tiempo en formarse, presenta mayor calidad. Pero inclusive esta respuesta es diferente entre variedades.

Conclusiones

Existe respuesta diferencial a la formación de callos entre variedades y tipo de explantes de crisantemo. Los callos formados de explante de tallo son los más óptimos ya que no presentan friabilidad y tienen mayor peso.

Literatura citada

- Barrera, O. A., Cabrera, R. J., García, P. F., Alcántara, N. J.C., Sánchez, M. E., Cruz, M. J. y Granada, C. L. 2007. Producción de Crisantemo (*Dendranthema spp*) en Morelos. Folleto técnico no. 27. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Boase M.R., Miller R. y Delores, S.C. (1997). *Chrysanthemum* systematics, genetics and breeding. En: Janick J (ed) *Plant Breeding Reviews*. Vol. 14. John Wiley and Sons, New York. 480 pp.
- Hernández, S. I. 2007. Regeneración clonal de alcornoques adultos (*Quercus suber* L.) mediante embriogénesis somática. Tesis de doctoral. Universidad de Alcalá.
- Hodson, J.E.; Forero, A.; Cancino, G.; Moreno, A.M.; Monsalve, L. E. y Acero, W. (2008). *In vitro* regeneration of three *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflora*) varieties "via" organogénesis and somatic embryogenesis. *Universitas scientiarum* 13 (2): 118-127.
- Holst, G.; Mare, K.; Wiert, M.; Postman, H. y Abbestee, R. 1996. Somatic embryogenesis Method. United States Patent number 5: 587-312.
- Martínez, M. S. de J.; Gómez, K. R.; Posada, P. L.; Barbón, R. R.; Acosta, S. M.; Reyes, V. M.; Pérez, B. M.; Torres, R. D.; Pons, C. M.; La O, C. M.; Aguilera Ch. A. y Tejeda, G. M. 2012. Efecto de dos citoquininas, ácido ascórbico y sacarosa en la obtención de plantas *in vitro* de *Sorghum bicolor* para la formación de callos. *Revista Colombiana de Biotecnología* 14: 101-110
- Orozco, H. M.E. y Mendoza M. M. 2003. *Revista Científica Multidisciplinaria de la Universidad Autónoma del Estado de México*. 10(1): 29-42.
- Pérez P. J., Alvarado C. Y., Gómez K. R., Jiménez G. E., Orellana P.P. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba.
- Piovano, M.V.; Barssia, F. y Pissis, G. 2011. Cultivo de Crisantemos en Mendoza. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Vázquez, G. L.M. 2006. Plantas ornamentales de México. Red de ornamentales. <http://www.uaemex.mx/ornamentalesred/> (Consultado el 6 de agosto de 2013).
- Vidales, F. I. (2002) Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de Aguacate (*Persea americana* Mill.). Tesis de doctorado. Universidad de Colima.

Anexo 7. Lista de reactivos utilizados.

REACTIVO	FÓRMULA	MARCA
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	Sigma
Ácido clorhídrico	HCl	Baker
Ácido diclorofenoxiacético	2,4-D	Sigma
Ácido tricloroacetico TCA	Cl ₃ CCOOH	Baker
Agar- Agar (Polvo)	-----	Meyer
Bencil amino purina	6BAP	Sigma
Cloruro de calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	Baker
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	Baker
Cloruro de magnesio	MgCl ₂ .	Baker
Cloruro de potasio	KCl	Baker
Cloruro de Sodio	(NaCl)	Baker
Cloruro férrico	FeCl ₃ .6H ₂ O	Baker
Dietanolamina (bis-2-Hidroxietilamida)	C ₄ H ₁₁ NO ₂	Sigma
D-Pantotenato de calcio	C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	Fluka
EDTA (Na ₂ EDTA) sal disódica del ácido etilen dinitrilo tetracético	C ₁₀ H ₁₄ Na ₂ N ₂ O ₈ .2H ₂ O	Baker
Etanol	CHCl ₃	Merk
Fitagel (Phytigel)	-----	Sigma
Glicina	C ₂ H ₆ NO ₂	Merck y Bio Rad
Hidroxido de potasio	KOH	Baker
Inositol	C ₆ H ₁₅ O ₁₅ P ₃	Merk
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Baker
Myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	Sigma
Nitrato de amonio	NH ₄ O ₃	Baker
Nitrato de potasio	KNO ₃	Baker

Sacarosa	$C_{12} H_{22} O_{11}$	Baker
Sulfato de magnesio (7-Hidrato, cristal)	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Baker
Sulfato de zinc	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Baker
Sulfato ferroso	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Baker
Sulfato cúprico	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Baker
Thidiazuron	TDZ	Sigma
Tiamina Diclorato	$C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS \cdot xH_2O$	Merck
Tween	Tween 20	Boehringer Mannheim
Yoduro de potasio	KI	Baker

Anexo 8. Equipo utilizado.

EQUIPO	MARCA Y/O ESPECIFICACIONES
Autoclave	Horizontal; Marke Forge
Campana de flujo laminar horizontal	Edge Gard The Baker Company.
Agitador magnético	Cleaver Scientific Ltd
Potenciómetro	HANNA Instruments HI 2211
Microscopio estereoscópico	Stemi DV4, Carl Zeiss
Báscula analítica	ae ADAM PGW 153e
	ae ADAM PW 124