

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA- IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

MÁXIMA HALOTOLERANCIA DEL TEJIDO FOLIAR
in vitro DE *Suaeda diffusa* W. (Chenopodiaceae)

Informe Final del Trabajo de Investigación

Que Presenta:

Lic. en Ecología FEDERICO MINCHACA SANJUÁN

Para Obtener el Grado Académico de:

ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

(Cultivo de Tejidos Vegetales)

México, D.F.

1997

Matrícula: 96100720

Asesor: Francisco Cruz Sosa.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Fitoquímica (S-153) del Departamento de Biotecnología de la U.A.M. - Iztapalapa, bajo la asesoría del Dr. Francisco Cruz Sosa a quien agradezco su apoyo para realizar este trabajo de investigación. Así mismo deseo manifestar ampliamente el apoyo recibido por parte del Coordinador de Posgrado en Biotecnología, Dr. Gerardo Saucedo Castañeda, por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mi Asesor:
Dr. Francisco Cruz Sosa.

A la comisión de Posgrado en Biotecnología:

- Dr. Gerardo Saucedo Castañeda.
- Dra. Isabel Guerrero Legarreta.
- Dra. Araceli Tomasini Campocosio.
- Dr. Jorge Gómez Hernández.

Un agradecimiento muy especial a: M. en B.E. José Ángel Lechuga Corchado por sus valiosas enseñanzas en Biotecnología Vegetal.

A los Biólogos Juan Orozco Villafuerte, Salvador Meráz Vázquez y Manuela López Villavicencio por sus valiosos consejos y a esta última por su sensatez ante el éxito.

A los profesores Dr. Alejandro Hernández, M. en C. Ignacio García Martínez, M. en C. Jorge Haro Castellanos, María del Pilar Enríquez y José María Barba.

A la Dra. en C. Herminia Loza Tavera por sus valiosos consejos y el apoyo prestado desinteresadamente.

A los estudiantes Guillermo Lara, Juan Carlos Peña Ávila, María Contreras, Olga Nava Vega, Paz Castillo y Claudia Larque.

Al Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

A los doctores José Marcelino Camarena Bolaños y neurocirujano Alfonso Escanero Salazar.

DEDICATORIA

A mis padres:

M. en H. Aída Osvelia Sanjuán Victoria
Lic. en Derecho Federico Minchaca Flores

A mis hermanos:

Ing. Biomédica María Luisa Minchaca Sanjuán (Mayo)
Psicóloga Social María de Montserrat Minchaca Sanjuán (Monsy)
Lic. en Derecho Raúl Minchaca Sanjuán (Fratello)
Ing. en Electrónica Eduardo Minchaca Sanjuán (Tata)
Javier Minchaca Sanjuán (Javierzinho)

A mis tíos, sobrinos y obviamente primos

En memoria de Luisa Victoria Campos, Rutilio Sanjuán Galicia,
Raúl Sanjuán Victoria, Joaquín Sanjuán Mendoza.

RESUMEN

Se indujo el callo de *Suaeda diffusa* en medio B5 y medio MS con 3 concentraciones de ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) y 3 concentraciones de cinetina en 9 combinaciones, siendo exitosa la inducción en la siguientes combinaciones: 1.81 μM de 2,4-D (0.4 mg/L), ácido 2,4-diclorofenoxiacético 4.65 μM (1.0 mg/L) de cinetina (80% de éxito a los 41 días) y 1.81 μM (0.4 mg/L) de 2,4-D con 46.5 μM (10.0 mg/L) de cinetina (30% de éxito a los 63 días), se cuantificó la división celular en medio líquido con 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) en 8 concentraciones, asimismo se seleccionó el callo mas halotolerante en medio MS con 9 concentraciones diferentes de NaCl: 25 mM NaCl, 50 mM NaCl, 100 mM NaCl, 125 mM NaCl, 150 mM NaCl, 200 mM NaCl, siendo la concentración mas exitosa 100 mM NaCl (10% de inducción de callo) aunque el explante no prospera en las demás concentraciones: sobrevive en medio MS añadiendo 0.4 mg/L de 2,4-D con 1.0 mg/L de cinetina, la misma concentración fue la mas exitosa, la germinación de las plántulas fue además a 25 mM y 50 mM NaCl a los 7 días suplementado con sacarosa al 3.0%, comparándose los resultados con otros vegetales de la familia Chenopodiaceae y otras halófitas.

CONTENIDO

Resumen	1
Introducción	2
Importancia de la Biotecnología Vegetal	2
Aplicaciones Potenciales	3
Importancia de la especie	3
Antecedentes	4
Historia de la Biotecnología Vegetal	5
Panorama Histórico Breve de la Biotecnología Vegetal	6
Hipótesis	7
Objetivos	7
Objetivo General	7
Objetivos Particulares	7-8
Metas	8
Metodología	9
Material biológico (<i>S. diffusa</i>)	9
Medios de cultivo (B5, MS)	9
Tratamientos	10-11
Cultivo de meristemos	11-12
Diagrama de la Inducción	14
Diagrama de la Evaluación Celular	15
Diagrama de la Selección de Tejido Halotolerante	16
Diagrama General de Actividades	18
Resultados y Discusión	19
Inducción de callo	19
Células en suspensión	19-20
Cultivo de meristemos	21
Selección de tejido halotolerante	21-22
Selección de semillas	21
Conclusiones	23
Literatura citada	24-25
Anexo 1	
Anexo 2	
Productos del trabajo	
Nombre del Congreso donde fué presentado el trabajo	
Resumen del trabajo presentado en Congreso	
Carta de Aceptación al Congreso	

INTRODUCCIÓN

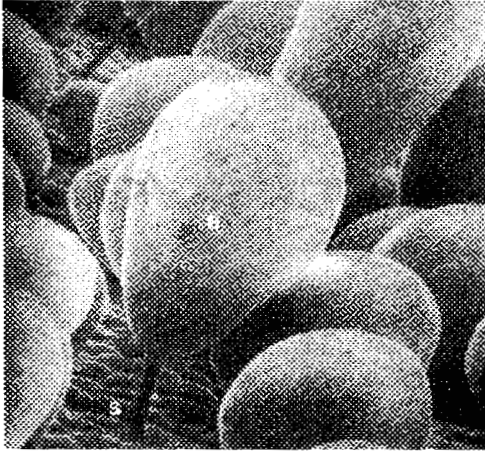
Actualmente se pierden miles de hectáreas potencialmente utilizables en la agricultura por la salinidad (Salisbury y Ross, 1996), ejemplos claros los tenemos en el Valle de Texcoco, Chalco, Chimalhuacán, Ecatepec, en donde sin embargo se han adaptado a esos ecosistemas vegetales que toleran la salinidad y no son muy sensibles a ella tales como *Atriplex spongiosa* (fig. 1a), *Tamarisco pendrata* (fig. 1b) y *Suaeda diffusa* entre otras de la familia Chenopodiaceae principalmente.

S. diffusa es una planta herbácea anual perenne, perteneciente a la familia Chenopodiaceae, erguida ó postrada, glabra o casi glabra de 20 cm a 1 m de alto, ramas ascendentes ó divergentes, flexuosa; hojas lineares cilíndricas ó a veces algo aplanadas de 7 a 2.5 cm de largo mientras que las inflorescencias son reducidas. El tamaño de la semilla es de alrededor de 1 mm y color negro ó rojo intenso *S. diffusa* es una planta nativa de Ecatepec, Texcoco, Chimalhuacán, Xochimilco y Chalco (Rzedowski, 1979).

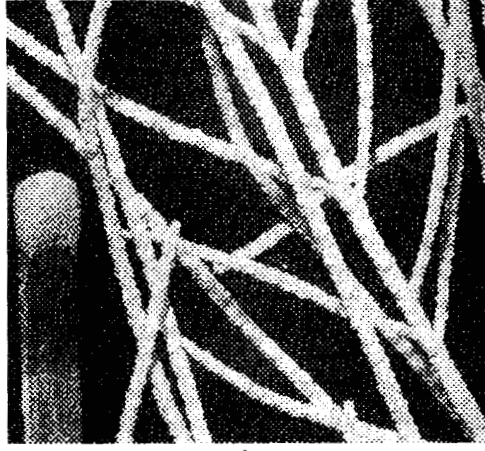
IMPORTANCIA DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

La importancia de cultivar plantas en un medio no influenciado por algún material de soporte sólido ó supuestamente inerte fue primero comprobar la acción de los fitorreguladores que anteriormente se conocían por bioneso. Los fisiólogos vegetales han estado cultivando plantas en soluciones nutritivas. (Ver Anexo 1 Medios de cultivo)

Estas tienen la ventaja adicional de suministrar condiciones conocidas con exactitud y reproducibles para el desarrollo de plantas experimentales. El requisito básico de un medio exitoso es que provea todos los nutrientes necesarios en cantidades adecuadas para que sean disponibles para la planta y otras condiciones satisfactorias (pH por ejemplo). más recientemente los cultivos de tejidos vegetales han sido de capital importancia en la obtención de



a



b

Fig. 1. a) Superficie foliar de *Atriplex spongiosa* mostrando las vejijillas llenas de solución de NaCl. b) Tallos de *Tamarix pendantra* con cristales de NaCl precipitados de escala se muestra un cerillo (tomado de Salisbury, 1996).

metabolitos secundarios y técnicas de ingeniería genética entre otros (Salisbury y Ross, 1996; Thiyagarajah, 1996; Q.V. Le, 1996; Bonherth. *et. al.*, 1996; Iuchi. *et. al.*, 1996.).

La capacidad de los callos de regenerar plantas completas representa una herramienta para seleccionar plantas con resistencia a la sequía, estrés salino, patógenos y determinados herbicidas, o con características útiles (Salisbury y Ross, 1996).

APLICACIONES POTENCIALES:

- 1.- Herramienta de selección de plantas con resistencia a la sequía.
- 2.- Herramienta de selección de plantas con resistencia al estrés salino.
- 3.- Obtención de algún metabolito secundario.
- 4.- Fusión de protoplastos.
- 5.- Micropopagación.
- 6.- Estudios a nivel bioquímico.
- 7.- Inducción de tolerancia a la salinidad en especies de mayor importancia comercial, por electroporación en cereales ó utilizando *Agrobacterium tumefaciens* u otras técnicas de ingeniería genética (enzimas de restricción, plásmidos, microinyección, biobalística).
- 8.- Recuperación de suelos salinos por *S. diffusa*.
- 9.- Herramienta de estudio de morfogénesis y organogénesis.

Las utilizaciones posteriores por las cuales se elabora el presente trabajo son los puntos 1.2.5.6.7.y 8.

IMPORTANCIA DE LA ESPECIE

Algunos estudios señalan al romerito (*Suaeda diffusa*) como una planta que tiene

puede contribuir a la recuperación de suelos salinos por su alta absorción de sales (Richard, 1979; Foth, 1992). Se entiende por suelos salinos a un suelo no sódico que contiene suficiente sal soluble como para reducir su productividad. La conductividad eléctrica es >2 mohms por cm a 25°C . Mientras un suelo salino-sódico es aquel que contiene una combinación de sales solubles y una cantidad de sodio intercambiable suficiente para interferir en el desarrollo de la mayoría de las plantas cultivadas. La conductividad eléctrica y la relación de sodio del extracto de saturación son, respectivamente >2 milimoles por cm a 25°C y de >15 . El pH de ordinario es de 8.5 ó menos en la pasta de suelo saturado. Adicionalmente los romeritos (*S. diffusa*) tradicionalmente se consumen como alimento de abstinencia (vigilia).

ANTECEDENTES

No existen antecedentes sobre *S. diffusa* excepto un servicio social de la UAM-Xochimilco (Cuevas Mendoza *et. al.*, 1995) y un par de trabajos sobre el género (Mahmood *et. al.*, 1996 y Thiyagarajah *et. al.*, 1996), sin embargo la literatura encontrada sobre halotolerancia tiene los principales representantes en *Suaeda fructicosa* (Mahmood *et. al.*, 1996), *Suaeda maritima* (Thiyagarajah *et al.*, 1996), *Arabidopsis thaliana* (Vucich, 1996; Reza, 1993; Leymarie, 1996; Cramer *et. al.* 1996), *Cicer aretinum* cv-203 (Pandey y Ganapathy, 1984), *Pachycereus pringlei* (Nolasco *et. al.* 1996), *Zea maize* (Azazeith, 1991; Cramer, 1992; Maiti, 1996; Zidan *et. al.*, 1992; Nordquist *et. al.*, 1992), *Lycopersicon esculentum* GC-793 (Guerrier, 1996), *Pisum sativum* (Olmos y Hellin, 1996; Olmos y Hellin, 1996), *Sorghum bicolor* (Weimburg *et. al.*, 1988; Reddy *et. al.* 1996; Maiti *et. al.*, 1996; Grieve *et. al.* 1988; Bacci *et. al.*, 1996; Colmer., 1996), *Medicago sativa* L. (Edwards, 1996; Felle, 1996; Safarejad *et. al.*, 1996), citando los artículos mas importantes y recientes.

Vulgarmente conocida como romerito *S. diffusa* es un vegetal que se consume

como alimento de abstinencia en la vigilia y Navidad, se abre la posibilidad de transferir la halotolerancia de *S. diffusa* en plantas de mayor interés comercial. las publicaciones sobre el género *Suaeda* son muy escasas encontrándose únicamente 3 de ellas (Mahmood *et. al.*, 1996; Thiyagarajah *et. al.*, 1996 y Cuevas Mendoza, *et. al.* 1995).

Se han perdido millones de hectáreas de suelo cultivable porque las sales del agua de riego se acumulan en el suelo (Salisbury y Ross. 1996), la salinidad del suelo restringe el crecimiento en regiones templadas (Greenway and Muns, 1980). A mediano o largo plazo, se prevé la creación de plantas tolerantes a salinidad del suelo lo que permitirá ampliar las superficies cultivables del país en varios millones de hectáreas (Vázquez y Batis, 1996; Richard, 1977) de acuerdo con Nabors N.W. *et. al.*(1985), la tolerancia a salinidad está asociada a la tolerancia a sequía y viceversa en las siguientes plantas: arroz, trigo y avena, y las plantas obtenidas por selección con NaCl en células cultivadas son también tolerantes a la falta de agua (Robert, 1985).

HISTORIA DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

En los últimos quince años el cultivo de células de plantas y tejidos vegetales ha tenido un notable desarrollo, sin embargo los primeros trabajos reportados acerca del tema datan del siglo pasado (ver Anexo 1) solo recientemente ha tenido una explotación comercial en áreas tan diversas como la agricultura, la industria farmacéutica, la horticultura, la silvicultura.

A continuación se dá un panorama histórico grueso de la Biotecnología Vegetal (Schaumader y Doebel. 1990).

Panorama Histórico General de la Biotecnología Vegetal (Tabla 1).

Especie	RESULTADO
<i>Tradescantia sp.</i>	Primeros experimentos de cultivo con aislamiento células de plantas, 1902.
<i>Zea maize</i>	Cultiivo de raíz <i>in vitro</i> obtenida de cultivos permanentes, 1922.
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Primeros cultivos permanentes de raíces, 1934.
<i>Daucus, Picea, Phaseolus vulgaris</i>	Primeros cultivos en suspensión de células simples ó agregados celulares, 1954.
<i>Daucus</i>	Cultivo de cuerpos embrionarios en tejidos, 1958. Obtención de células clonadas en cultivos de agar, 1960.
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Método para obtener un gran número de protoplastos de tejidos de plantas, 1960. Primeros cultivos en masa de células de plantas en suspensión, 1959 y 1960.
<i>Cymbidium</i>	Multiplicación clonal de plantas para horticultura en cultivo de tejidos, 1963.
<i>Nicotiana y Datura</i>	Producción <i>in vitro</i> de plantas haploides de polen inmaduro en cultivo de anteras, 1967.
<i>Nicotiana</i>	Aislamiento de mutantes auxotróficas de cultivo de células, 1971.
<i>Nicotiana</i>	Primer cuerpo híbrido interespecifico de plantas fusionando protoplastos Primer cuerpo híbrido interespecifico de plantas fusionando protoplastos 1972
<i>Solanum tuberosum y Lycopersicon esculentum</i>	Primer cuerpo somático híbrido intergenético de plantas por fusión de protoplastos, 1978

HIPÓTESIS

La hipótesis manejada es que no es conocido el organoide que otorga tolerancia a salinidad por lo cual se induce tejido indiferenciado (callo), del cual se evaluará su crecimiento por conteo en cámara de Neubauer y será expuesto a diferentes concentraciones salinas para seleccionar el tejido que presente mayor halotolerancia.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtención y mantenimiento de callo a partir de un explante de *Suaeda diffusa*, identificación del tratamiento óptimo para su crecimiento, obteniendo el callo con mayor halotolerancia.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Inducción de callo proveniente de explantes foliares de *S. diffusa* por medio de la auxina y citocinina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina en 9 diferentes concentraciones. (altas concentraciones de auxinas y bajas de citocininas, bajas concentraciones de auxinas y altas de citocininas, medias concentraciones de ambos fitorreguladores ver tabla 1).
- Germinación de semillas de *S. diffusa* sin fitorreguladores.
- Subcultivar en condiciones de esterilidad, en la campana de flujo laminar los callos provenientes de los tratamientos que lo indujeron con el fin de obtener la mayor biomasa de callo posible en medio líquido B5 utilizando matraces en agitación a 120 rpm con temperatura constante de 25⁰C.
- Evaluar el crecimiento celular si el callo aumenta notablemente su biomasa visualmente ó si este (el crecimiento celular) no es notorio tomando una alícuota del medio líquido utilizado y haciendo dos conteos celulares en cámara de Neubauer a diferentes tiempos para cada tratamiento siendo la

diferencia el incremento celular.

- Obtener callos de *S. diffusa* por medio de los tratamientos ya conocidos.
- Subcultivar los callos obtenidos en medio B5 suplementado con sacarosa al 3.0%, agar al 0.8% con las concentraciones de NaCl utilizadas por Pandey y Ganapathy con callos de *Cicer arietinum* cv. BG-203 (Tabla 5) con el fin de seleccionar los callos de mayor halotolerancia de *S. diffusa* así como un rango de obtención de callos con halotolerancia para posteriores experimentos como otros que se han realizado referentes al tema de la salinidad (Pandey y Ganapathy, 1984; Misra *et. al.* 1996; Zidan, 1992; Pedersen, 1996) pudiéndose manejar los resultados obtenidos para experimentos y beneficios posteriores.
- Obtener la máxima halotolerancia del callo de *S. diffusa* utilizando las concentraciones de NaCl para el aislamiento de callo halotolerante de *Cicer arietinum* (Pandey y Ganapathy, 1984) utilizando tejido foliar.
- Obtener datos sobre la halotolerancia de *S. diffusa* en germinación comparada con otra especie del mismo género: *S. fruticosa* (Mahmood *et. al.*, 1996).
- Adición de los resultados de germinación de *S. diffusa* con respecto a otras especies del mismo género, especie *S. fruticosa* (Mahmood *et. al.*, 1996) y *S. maritima* (Thiyagarajah *et. al.*, 1996).
- Un experimento alterno fuera del objetivo principal se llevará cabo con cultivo de meristemas de *S. diffusa* con el fin de obtener callo. dado que el callo es propio de tejidos jóvenes, en medio sólido (agar 0.8%) sin reguladores del crecimiento vegetal en 4 tratamientos con y sin sacarosa a un pH de 8.5 el cual se ajustará con NaOH al 0.1 N

METAS

Obtención del Grado académico de Especialización en Biotecnología (Cultivos Vegetales)

Presentación de resultados en un Congreso Nacional

METODOLOGÍA

Material Biológico

En el primer experimento se utilizó como explante tejido foliar de *S. diffusa* procedente de la zona chinampera de Xochimilco, asimismo se utilizó tejido de esta especie adquirido en un centro comercial, actualmente se tiene tejido desarrollado a partir del crecimiento de semilla de *S. diffusa* y de planta de la zona chinampera de Xochimilco se utilizó para su transporte al laboratorio una solución antioxidante compuesta por 100 mg/L de ácido cítrico y 100 mg/L de ácido ascórbico y/o refrigerando el tejido vegetal en caso de provenir de algún centro comercial.

Medios de Cultivo

Como siguiente paso se sembraron 20 frascos con tejido foliar por tratamiento en condiciones estériles incubándose 10 en iluminación y 10 en oscuridad. se utilizó para su lavado detergente al chorro de agua durante 5 min y para su desinfección hipoclorito de sodio comercial al 50% durante 8 min diluido en agua estéril dentro de la campana de flujo laminar con 3 lavados de agua estéril se utilizó la misma metodología en los tratamientos comparativos variando el pH. Se sembraron plántulas en un tratamiento testigo sin citocininas ni auxinas. Para la elaboración del medio se empleó medio B5 (Gamborg, 1968) suplementado con sacarosa al 3.0%, con diferentes concentraciones de la citocinina cinetina y la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (tabla 2), el pH se ajustó con NaOH al 0.1 N a 8.5 dado que *S. diffusa* es una planta halófila (Fig. 2).

	2,4-D (μM)		
	1.81 (0.4 mg/L)	18.1 (4 mg/L)	36.2 (8 mg/L)
Cinetina μM			
0.0	B5-1	B5-2	B5-3
4.65 (1 mg/L)	B5-4	B5-5	B5-6
45.5 (10 mg/L)	B5-7	B5-8	B5-9

Tabla 2. Tratamientos utilizados durante el trimestre 96-I, suplementados con sacarosa al 3.0%, agar al 0.8%, pH=8.5 ajustado con NaOH al 0.1 N

TRATAMIENTOS

La inducción de callo se hará como sugirieron Bidwell en 1987 y Skoog y Leonard, 1970; Skoog y Armstrong, 1968; Miller, 1961: con auxinas y citocininas probándose una amplia gama de concentraciones de auxinas y citocininas (Anexo 1) en caso de encontrarse inducción de callo en concentraciones diferentes a las reportadas: bajos niveles de auxinas y bajos niveles de citocininas en mg/L inducen callo en *Nicotiana tabacum* y también altos niveles de auxinas y un amplio espectro de concentraciones de citocininas en mg/L inducen callo en *Nicotiana tabacum*, aunque con bajas concentraciones de citocininas se ha observado un callo "aguado" compuesto por grandes células que han crecido en expansión siendo a mayores concentraciones de citocininas el callo denso y compuesto por un gran número de células meristemáticas (Skoog y Leonard, 1968; Skoog y Armstrong, 1970; Miller, 1961; Bidwell, 1987), la citocinina utilizada es la cinetina y la auxina 2,4-D en este caso particular; es posible visualizar las actividades llevadas a cabo durante la especialización (Fig. 4).

Se subcultivaron los callos obtenidos siguiendo la metodología anterior sin agar subcultivándolos en 100 mL contenidos en matraces de 250 mL cambiando los fitorreguladores por 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) (Tabla 2) (Anexo 1) con el fin de obtener mayor biomasa; una vez obtenida esta se subcultivaron en 100 mL de medio líquido P5 (Gamborg, 1968) (composición del mismo en el anexo) en matraces de 250 mL ajustando el pH a 8.5 con NaOH (0.1 N).

N siendo 4 matraces por tratamiento; los primeros tres tratamientos y el testigo (Tabla 3) y los restantes tratamientos en matraces de 125 mL, incubándose a una agitación de 120 rpm, a una temperatura de 25⁰C, el testigo y los primeros tres tratamientos y el testigo. (Fig. 1) después de 71 días de incubación se contó el incremento celular tomando una alícuota contando el número de células en una cámara de Neubauer haciéndose el conteo en condiciones estériles con un microscopio óptico a 40 X y extrapolando el resultado a 100 mL, la diferencia entre la primera y la segunda cuenta (tiempo inicial y tiempo final) con una diferencia de 7 días se tomó como la evaluación celular (Fig. 2).

ANA mg/L	BAP mg/L			
	0.0	0.1	1.0	10.0
0.0	testigo	B5-10	B5-11	B5-12
1.0	B5-13	B5-14	B5-15	B5-16

Tabla 3. Combinaciones de ANA y BAP con un pH de 8.5 en medio líquido.

CULTIVO DE MESRISTEMOS

Asimismo se llevó a cabo un experimento alterno con el cultivo de meristemos con el fin de obtener callo y familiarizarze con la técnica (Zhang *et. al.*, 1996) este se llevó a partir de plántulas sembradas *in vitro* en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a un pH= 8.5 ajustándose con NaOH al 0.1 N suplementándolo con sacarosa al 3.0% y agar al 0.8% sin fitorreguladores, sembrándose en una campana de flujo laminar en condiciones estériles, posteriormente subcultivándose los meristemos a las concentraciones que muestra la tabla 3, estos cultivos de meristemos se realizaron en la campana de flujo laminar utilizando un bisturí para el corte de los meristemos bajo un microscopio estereoscópico, elaborando los diferentes tratamientos con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y suplementándose con sacarosa al 3.0% según el tratamiento que se tratase (tabla 4), a un pH de 8.5 el cual se ajustó con NaOH 0.1 N siendo el testigo únicamente agar al 0.8% a un pH= 8.5 con 15 frascos por tratamiento

	Sin Sacarosa	Sacarosa 3%
Medio MS	Testigo	MS-1
	MS-2	MS-3

Tabla 4. Combinaciones de medio MS y Sacarosa a pH 8.5

Se utilizó el tratamiento B5-4 (Tabla 1) como control usándose a diferentes concentraciones de NaCl en 6 tratamientos salinos (Tabla 5 y 6) con 10 frascos por tratamiento y control utilizando medio MS (Murashige y Skoog, 1962) pero con la misma metodología usada el primer trimestre, los explantes fueron obtenidos en un centro comercial y en invernadero. Se prepararon 10 frascos por concentración salina (tabla 5) tanto para la siembra de explantes como para la germinación (Tabla 6), los cuales fueron esterilizados en autoclave, durante 15 min a una presión de 15 psi y a una temperatura de 121°C, la incubación se llevó a cabo con un fotoperíodo de 18 h luz y 6 h de oscuridad siendo la radiación $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 3).

En un experimento alterno el cual persigue también los objetivos del trimestre se hicieron germinar 10 semillas por frasco utilizando 10 frascos por tratamiento salino usado por Pandey y Ganapathy en *Cicer arietinum* sin fitoreguladores (Pandey y Ganapathy, 1984) (tabla 6) utilizando medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con la metodología utilizada en el primer trimestre anterior, excepto que no hubo adición de NaOH antes de la gelificación del medio por lo que el valor pH no fue ajustado a 8.5 en los frascos en germinación.

	2,4-D 0.4 mg/L		
Cinetina 1 mg/L	Control	25 mM NaCl	50 mM NaCl
	100 mM NaCl	125 mM NaCl	150 mM NaCl
	200 mM NaCl		

Tabla 5. Diferentes concentraciones de NaCl en mM y frascos control utilizados (10 frascos por tratamiento) utilizando 2,4-D y cinetina como fitoreguladores a un pH 8.5 medio de cultivo utilizando MS (Murashige y Skoog, 1962)

Cinetina μM	2,4-D μM	NaCl (mM)						
		0.0	25	50	100	125	150	200
4.65	1.81	B5-17	B5-18	B5-19	B5-20	B5-21	B5-22	B5-23
46.5	18.1	B5-24	B5-25	B5-26	B5-27	B5-28	B5-29	B5-30

Tabla 6: Tratamientos llevados a cabo durante el trimestre 96-P.

Porcentaje de callo inducido		
Control 60 %	0	0
100 mM NaCl 10 %	0	0
0	0	0

Tabla 7. Porcentaje de callo inducido, se puede observar que únicamente en los frascos control (60%) y con una concentración de 100 mM NaCl (10%) es inducido el callo a partir de explantes foliares.

M de NaCl	Peso en gramos de NaCl	Tratamiento
25 mM NaCl	0.112 g de NaCl	1
50 mM NaCl	0.224 g de NaCl	2
100 mM NaCl	0.8448 g. de NaCl	3
125 mM NaCl	1.056 g de NaCl	4
150 mM NaCl	1.2672 g de NaCl	5
200 mM NaCl	1.6896 g de NaCl	6

Tabla 8. Concentraciones de NaCl por tratamiento y su equivalencia en gramos hubo 10 frascos por tratamiento, contando cada frasco con 10 semillas para germinar excepto en los tratamientos 3(12 frascos) ,4(12 frascos) y 6(15 frascos).

Concentración de NaCl	Porcentaje de germinación	Tiempo	Tipo de germinación	Tratamiento
25 mM NaCl	50%	7 días	plántulas vigorosas	1
50 mM NaCl	50%	7 días	plántulas vigorosas	2
100 mM NaCl	90%	7 días	plántulas vigorosas	3
125 mM NaCl	50%	5 días	plántulas normales	4
150 mM NaCl	60%	5 días	plántulas débiles	5
200 mM NaCl	80%	5 días	plántulas débiles	6

Tabla 9: Resultados de la germinación de *S. diffusa* a 6 diferentes concentraciones de NaCl

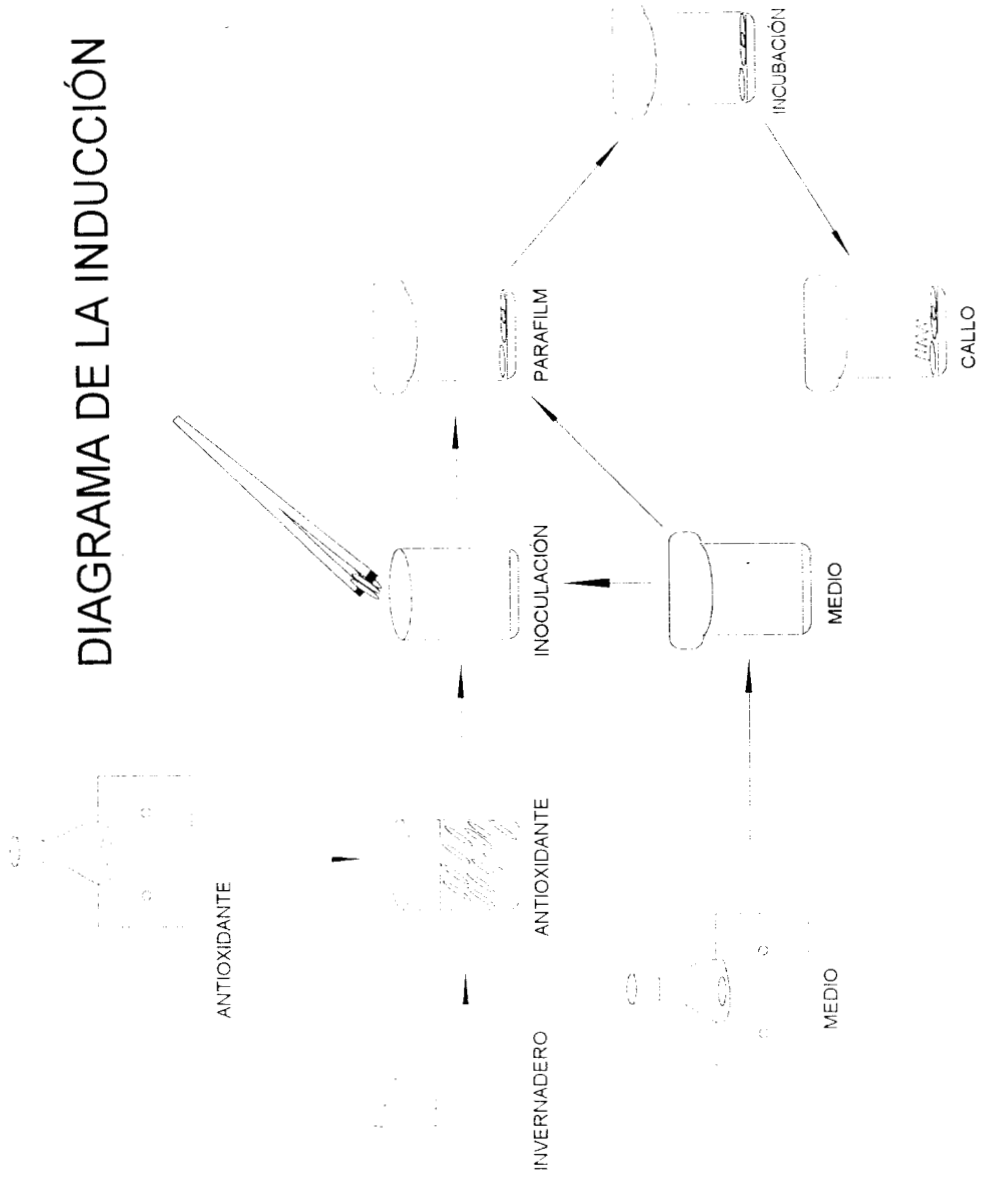


Figura 2. Inducción del callo de *Suaeda diffusa*

EVALUACIÓN DEL INCREMENTO CELULAR DEL CALLO

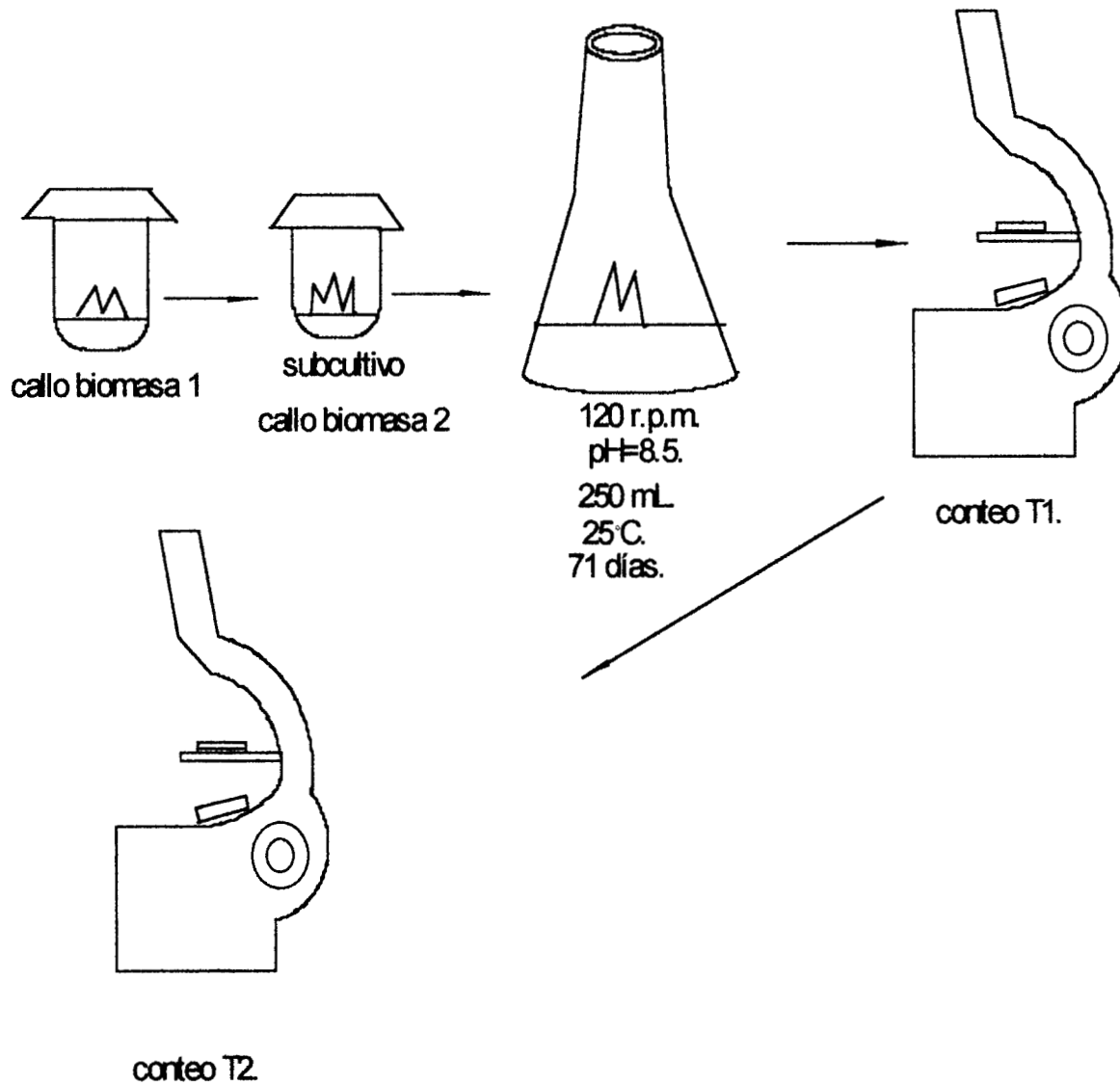


Figura 2. Inducción de callo, subcultivos, agitación a 120 rpm a 25°C durante 71 días en medio líquido (250 mL) pH=8.5, evaluación del crecimiento celular del crecimiento celular en 2 conteos en cámara de Neubauer con 7 días de diferencia.

SELECCIÓN DEL CALLO HALOTOLERANTE DE
Suaeda diffusa

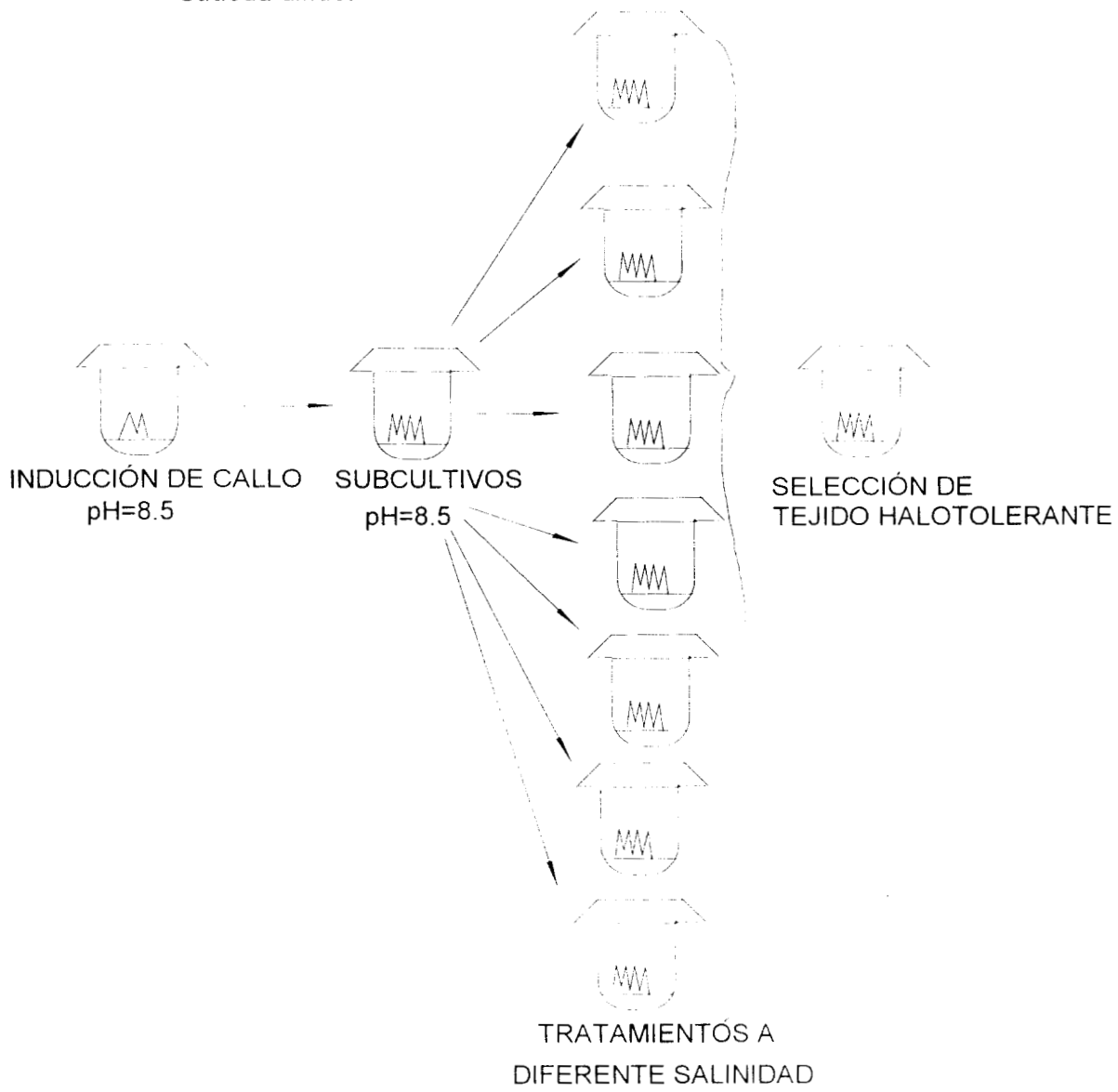


Figura 4. Selección del tejido halotolerante de *S. diffusa*.

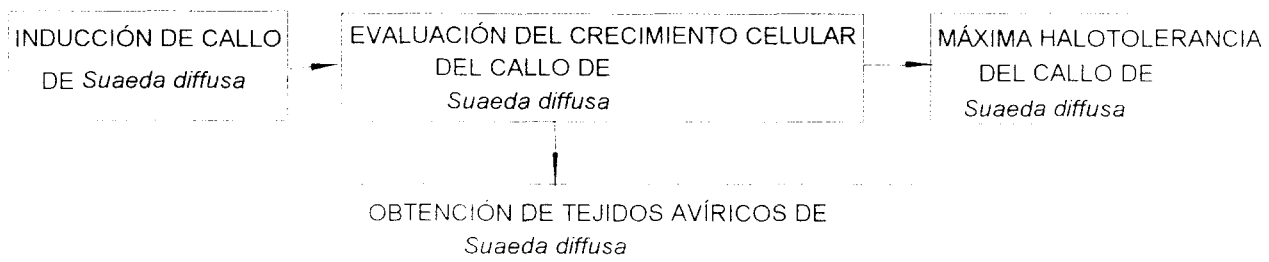


Figura 5. Visión global de las actividades llevadas a cabo en la especialización, adicionalmente junto con las actividades de máxima halotolerancia de tejido vegetal se llevó a cabo un experimento sobre germinación halotolerante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

INDUCCIÓN DE CALLO

La inducción de callo se consiguió con las concentraciones siguientes de auxinas y citocininas: 1.81 μM (0.4 mg/L) de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 4.65 μM (1.0 mg/L) de cinetina en un 80% de los casos (tratamiento B5-4) en un tiempo de 41 días, y 46.5 μM (10.0 mg/L) de cinetina y 1.81 μM (0.4 mg/L) de 2,4-D en un 30% de los casos (tratamiento B5-7) en un período de 63 días, en ambos casos utilizando un pH=8.5 el cual se ajustó con NaOH 0.1 N (Tabla 7) (Figura 2) (Anexo 2). Se observó que los callos obtenidos fueron densos en ambos tratamientos, esto es compuesto por un gran número de células meristemáticas, es de observar que en el tratamiento 10.0 mg/L de cinetina a pesar de que sólo un 30% de inducción de callo a un período de tiempo bastante largo (63 días) son “anormales” de acuerdo a los experimentos con *Nicotiana tabacum* clásicos de inducción de callo de Miller en 1961 y Skoog y colaboradores en 1968 y 1970, es singular asimismo observar el largo período que en ambos tratamientos exitosos se indujo el callo (Tabla 7).

CÉLULAS EN SUSPENSIÓN

Todos los matraces B5-13, B5-14, B5-15, B5-16, de 125 mL, 16 en total fueron contaminados por bacterias por no tener termostato el agitador donde se encontraban a una agitación de 120 rpm y no poderse controlar la temperatura a 25⁰C además de encontrarse relativamente expuestos: 1 matraz testigo, 3 matraces B5-10, 3 matraces B5-11, 1 matraz B5-12 resultaron contaminados a una temperatura constante de 25⁰C y una agitación de 120 rpm, el agitador donde se encontraban tiene cubierta por lo que únicamente se obtuvieron datos de los 4 primeros tratamientos las medidas de temperatura central fueron en el primer conteo los siguientes: moda del testigo=244, moda B5-10=500, moda B5-

11=1500, moda B5-12=250; media testigo= 333, media B5-10=500, media B5-11=1500, media B5-12=250. Media total= 562.5, Moda total= 250, mediana total= 375, varianza total= 209330.3964, varianza total= 457.5263887, cálculo de varianzas= 81.33802466. Los resultados tanto de tiempo inicial como de tiempo final se observan en la figura 5 observándose una mayor división celular en el tratamiento B5-11.

	2,4-D (μM)		
	1.81 (0.4 mg/L)	18.1 (4 mg/L)	36.2 (8 mg/L)
Cinetina μM			
0.0	--	--	--
4.65 (1 mg/L)	80%	--	--
46.5 (10 mg/L)	30%	--	--

Tabla 10. Tabla de resultados indicándose la inducción de callo positiva en porcentaje, tiempo de inducción: 41 días 80% y 63 días 30%.

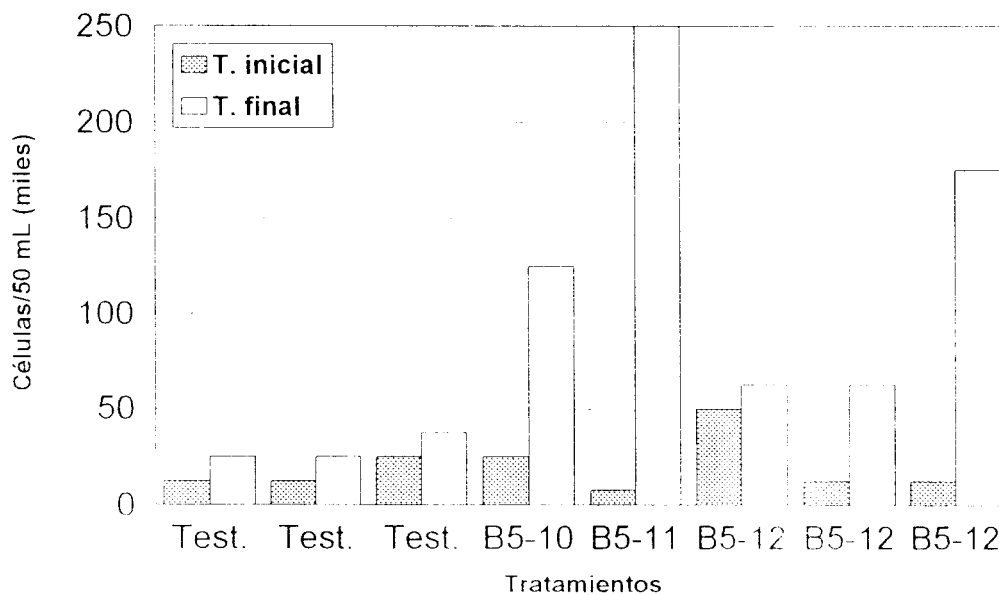


Figura 6. Combinaciones de NaCl con cinetina y 2,4-D para cultivo de callo de *Suaeda a frasa*

CULTIVO DE MERISTEMOS

Los resultados obtenidos a partir del experimento alterno fueron los siguientes: no hubo reacción de ningún tipo aunque se mantuvo la actividad biológica en los explantes de meristemo.

SELECCIÓN DE TEJIDO HALOTOLERANTE

El porcentaje de callo inducido halotolerante se muestra en la Tabla 7, el 80% de los explantes control conservaron su verdor a los 63 días de incubación, otros callos sembrados con anterioridad y no subcultivados sufrieron una oxidación bastante notoria. Conforme a los resultados obtenidos la inducción es de un 60% en el control y 10% de inducción de callo a 100 mM de NaCl se intuye que en un rango de 25 mM a 200 mM de NaCl a pH 8.5 en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa al 3.0% y agar 0.8% por los resultados obtenidos no es inducida la división celular indiferenciada (callo) y por consiguiente tampoco el crecimiento de los explantes foliares, conforme a lo observado la halotolerancia no es propia del tejido foliar, de acuerdo a las observaciones se propone la hipótesis de una probable oxidación acelerada por la salinidad se observó que a mayor concentración de NaCl la oxidación es mas rápida y con mas frecuencia observada la necrosis del tejido foliar: se induce de estos resultados que este organoide no participa de manera activa en la halotolerancia de *S. diffusa* como lo es en *Atriplex spongiosa* (salado) y *Tamarix pendants* (tamarisco) (Salisbury y Ross, 1996) (Figs 1a y 1b) es notorio que el medio B5 (Gamborg, 1968) utilizado en los trimestres anteriores induce mejor el callo (tabla 7) dado lo anterior es posible intuir que la división celular es favorecida por la existencia de compuestos nitrogenados propios del medio B5 (ver Anexo 1) así como intuir que en en la división celular los compuestos sulfatados no son de una alta relevancia, ya que estos compuestos se encuentran en mayor concentración en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (ver Anexo 1). Otra conclusión también de importancia es que el tejido foliar de *Quaeda*

diffusa soporta la salinidad a un nivel de sobrevivencia, pero esta (la salinidad) no es por los resultados obtenidos necesaria en la división celular en el tejido foliar por lo que se sugiere la hipótesis de que la halotolerancia de *S. diffusa* sea semejante a la de *Suaeda fruticosa* (Mahmood, 1996) y *Suaeda maritima* (Thiyagarajah, 1996) ya que los datos obtenidos indican esto además de pertenecer al mismo género (Rzedowski, 1979) pero con una halotolerancia durante la germinación como citan Mahmood *et. al.*, 1996 en el citado artículo se reporta una estimulación a la germinación de 48.7% sometido a una baja salinidad (10 dSm^{-1}) utilizando entre otras especies el género *Suaeda* representado por la especie *S. fruticosa* en este mismo artículo se menciona que en las hojas pertenecientes a la familia Chenopodiaceae existe una alta acumulación de Na^+ ; sin embargo Waisel en 1972 reporta que un mayor crecimiento no es necesariamente asociado a una mayor halotolerancia pero Waisel se refiere a todas las halófitas no a una familia en particular.

SELECCIÓN DE SEMILLAS

En el experimento alterno de germinación los resultados obtenidos son los siguientes: en el 50% de los frascos con 50 mM NaCl germinaron en su interior plántulas vigorosas a los 7 días, el 90% de los frascos con una concentración de 100 mM NaCl germinaron plántulas vigorosas a los 7 días, en el interior de 50% de los frascos con una concentración de 125 mM NaCl germinaron plántulas no vigorosas pero tampoco débiles a los 5 días, en el interior de 60% de los frascos con 150 mM NaCl germinaron plántulas débiles a los 5 días, en el interior de un 80% de los frascos con 200 mM NaCl germinaron plántulas débiles a los 5 días. (Fig. 4)(Tabla 9) interpretando los resultados se concluye que de una manera similar a la reportada en *S. fruticosa* (Mahmood *et. al.*, 1996) la germinación de *S. diffusa* es promovida a una baja salinidad comenzando la germinación a los 5 días siendo la mayor germinación a los 100 mM de NaCl (Tabla 7) siendo estos

resultados también semejantes a otros resultados (Thiyagarajah, 1996) con *Suaeda maritima* otras plantas de la familia Chenopodiaceae que siguieron semejante patrón fueron: *Kochia indica* y *Desmostachya bipinnata* aunque en ambas hubo una acumulación de Na^+ en las hojas, así como también *Atriplex crassifolia*, *Sporobolus arabicus*, *Polypogon monspeliens* y *Cynodion dactylon*, (Mahmood et. al., 1996) .Por otro lado los porcentajes de germinación fueron semejantes a los reportados por Reza et. al., (1993) con mutantes de *Arabidopsis thaliana* capaces de germinar bajo condiciones salinas.

CONCLUSIONES

- Las concentraciones óptimas de auxinas y citocininas para la inducción de callo son: 0.4 mg/L de 2,4-D y 1.0 mg/L de cinetina en un 80% de los casos.
- El callo inducido bajo las condiciones anteriores es de naturaleza densa y compacta compuesto por células meristemáticas.
- La mayor división celular del callo se dio con las siguientes condiciones: 1.0 mg/L de BAP en medio líquido a 120 rpm, a una temperatura de 25°C.
- Por los resultados obtenidos se induce una halotolerancia en *S. diffusa* semejante a la que reporta Mahmood para *S. fructicosa* esto es durante la germinación a una baja concentración de NaCl en el medio (10 dSm⁻¹) observado por Pandey y Ganapathy (Pandey y Ganapathy, 1984) en *Cicer aretinum* y los mutantes obtenidos por Reza *et. al.*, 1993 de *Arabidopsis thaliana* capaces de germinar en condiciones salinas, se habla pues de una estrategia halotolerante consistente en una rápida germinación, halotolerancia en la juventud del organismo principalmente.
- El tejido foliar de *S. diffusa* no interviene en la halotolerancia natural de *S. diffusa* y las plantas pertenecientes a la familia Chenopodiaceae reportadas hasta el presente.
- Existe una oxidación acelerada por la salinidad en el tejido foliar de *S. diffusa* a mayor concentración de NaCl mayor y mas rápida es la necrosis de tejido por oxidación.
- El medio B5 promueve con mayor eficiencia la división celular del tejido foliar de *S. diffusa* que el medio MS, pero la sobrevivencia y senilidad son notablemente mayores en tejido foliar de *S. diffusa* utilizando medio MS que en el medio B5.
- La salinidad inhibe la división celular de *S. diffusa* en el tejido foliar, es notorio como la halotolerancia de *S. diffusa* no es otorgada por la hoja en el organismo maduro, que este mismo tejido soporta una baja cantidad a tolerancia de las plantas pertenecientes a la familia Chenopodiaceae.

- La halotolerancia propia de *S diffusa* es del mismo tipo a la del género *Suaeda* anteriormente reportada en la germinación principalmente.

LITERATURA CITADA

- Azaizeth H. and E. Stedule: Effects of salinity on water transport of excised maize roots. *Plant Physiology* 97: (3), 1136-1146, 1991.
- Bacci, L.; Benincasa, F.; Rapi, B. Effect of growth temperature on the spectrophotometric characteristics of sorghum plants (*Sorghum bicolor* (L) Moench): Indices of stress- *European Journal of Agronomy* 5 (1-2) Oct.pags. 45-57, 1996.
- Ballibrea M.E., Santa Cruz A. M., Bolarín M.C., Pérez-Alfonseca F. Sucrolytic activities in relation to sink strength and carbohydrate composition in tomato fruit growing under salinity. *Plant Science* 118: 47-55, 1996.
- Bidwell R.G.S. *Fisiología Vegetal*. Primera edición en español. A.G.T. Editor S.A. 1987 México D.F.
- Bohnert, H.J.; Golldack, D.; Ishitani, M.; Kamasani, U.R.; Ram Salt tolerance engineering requires multiple gene transfers *Engineering Plants for Commercial Products and Applications* 792 115-125, 1996.
- Colmer, T. Teresa W.-M Fan, Higashi R.M. Lauchli A. Interactive effects of Ca^{++} and NaCl salinity on the ionic relations and proline accumulation in the primary root tip of *Sorghum bicolor*. *Physiologia Plantarum* 97: 421-424, 1996.
- Cramer G.R.: Kinetics of maize elongations. Responses of a Na-excluding cultivar and Na-including cultivar to varying Na/Cl salinities. *Journal of Experimental Botany* 43: (251), 857-864, 1992.
- Cramer, G.R.; Jones, R.L. Osmotic stress and abscisic acid reduce cytosolic calcium activities in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment* 19 (11) 1291-1298 Nov, 1996.
- Cuevas J.R. Mendoza, C.J. Lopez Gutiérrez y L.M. Rodríguez Sánchez. Concentración de Reguladores del Crecimiento para la Micropropagación de Romero (*Suaeda diffusa* W. Chenopodaceae). Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Coyoacán México D.F. Servicio Social. 1995.
- Schumader, H.P. y Doebel, P., *Acta Biotechnologica* 10: 501-516 (1990).
- Edwards, S-adenosyl-L-methionine metabolism in alfalfa cell cultures following treatment with fungal elicitors *Phytochemistry* 43(6) PG 1163-1169 DEC, 1996.
- Felle H. Control of cytoplasmatic pH under anoxic conditions and its implication for plasma membrane proton transport in *Medicago sativa* root hairs. *Journal of Experimental Botany* 47 (300) 967-973. 1996.
- Foth, H.D. *Fundamentos de la Ciencia del Suelo* 5ª reimpresión C.E.C.S.A. México, 1992.
- Gamborg O.L., Miller R.A. Ofima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50 151-158. 1968.
- Greenway H and Rana Munns. Mechanisms of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 36: 149-190. 1980.
- Grieve C. M. and E. V. Mass. Differential effects of sodium/calcium ratio on sorghum genotypes. *Crop Science* 28: 659-665 1988.
- Quemener Gilles. Effets de la salinité sur la croissance et le rendement de

- Lycopersicon pimpinifolium* and *L. esculentum* during short and long-term exposures to NaCl. *Physiologia Plantarum* 97: 583-591, 1996.
- Gupta, A.; Singhal, G.S. Effect of sodium and calcium chlorides, abscisic acid and proline on callus cultures of *Arachis hypogaea* L. *Biologia Plantarum* 38 (4) 525-529, 1996.
- Iuchi, S.; Yamaguchishinozaki, K.; Urao, T.; Terao, T.; Shinoz. Novel drought-inducible genes in the highly drought-tolerant cowpea: Cloning of cDNAs and analysis of the expression of the corresponding genes. *Plant and Cell Physiology* 37 (8) 1073-1082, 1996.
- Karafyllidis, D.I.; Stavropoulos, N.; Georgakis, D. The effect of water stress on the yielding capacity of potato crops and subsequent performance of seed tubers *Potato Research* 39 (2) pags. 53-163, 1996.
- Kumar, G.N.M.; Knowles, N.R. Oxidative stress results in increased sinks for metabolic energy during aging and sprouting of potato seed-tubers. *Plant Physiology* 112 (3) Nov. pags.301-313,1996.
- Leymarie, J.; Damerval, C.; Marcotte, L.; Combes, V.; Vartania Two-dimensional protein patterns of *Arabidopsis* wild-type and auxin insensitive mutants, *axr1*, *axr2*, reveal interactions between drought and hormonal responses. *Plant and Cell Physiology* 37 (7) Oct. pags. 966-975,1996.
- Mahmood K., K.A. Malik, M.A.K. Lodhi and K.H. Sheik. Seed germination and salinity tolerance in plant species growing on saline wastelands. *Biologia Plantarum* 38 (2): 309-315,1996.
- Maiti R.K. *et. al.* Drought and salinity resistance in maize. *Journal of Plant Physiology*. 148: 740-744,1996.
- Maiti, R.K., M. De La Rosa-Ibarra, and N.D. Sandoval: Genotypic variability In glossy sorghum lines for resistance to drought, salinity and temperature stress at the seedling stage. *Journal of Plant Physiology* 143: 241-244,1994.
- Miller C.O. Kinetin and related compounds in plant growth. *Annual Review of Plant Physiology* 12: 395-408, 1961.
- Misra, A.N.; Murmu, B.; Singh, P.; Misra, M. Growth and proline accumulation in mungbean seedlings as affected by sodium chloride. *Biologia Plantarum* 38 (4) pags 531-536,1996.
- Murashige, T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497 1962.
- Nabors N.W. *et. al.* NaCl tolerant tobacco plants from cultured Cells, *Z. Pflanzenphysiol* 97 :13-17, 1985.
- Nolasco H., Vega-Villasante F., Romero-Schmidt and Diaz-Rondero. The effects of salinity, acidity, light and temperature on the germination of seeds of cardón (*Pachycereus pringlei* (S. Wats.) Britton & Rose, Cactaceae). *Journal of. Arid Enviroment* 33: 87-94, 1996.
- Nordquist P.T., G.W. Herbert, B.A. Skates, W.A. Compton and J.P. Marwell: Phenotypic expression of diferent maize hybrid genotypes grown on saline-sodic soil. *Journal of Plant Nutrition*: 28 (10), 2137-2144, 1995.
- Omidi, E. and Heber, P. Cellular adaptation from salt. Salt Tolerant cell line of *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology* 148: 727-734 1996.
- Omidi, E. and Heber, P. Mechanisms of salt tolerance in a cell line of *Pisum sativum*: Biochemical and physiological aspects. *Plant Science* 110 (1) 1

oct 18 pags. 37-45,1996.

Pandey Ruchira and P.S Ganapathy. Isolation of sodium chloride-tolerant callus line of *Cicer arietinum* L. cv. BG-203. *Plant Cell Reports* 3: 45-47, 1984.

Pedersen, A.L.; Feldner, H.C.; Rosendahl, L. Effect of proline on nitrogenase activity in symbiosomes from root nodules of soybean (*Glycine max* L) subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany* 47 (303) pags. 1533-1539 Oct., 1996.

Q.V. Le., D.Bogusz., H. Gherbi., Lappartient A. Duhoux E., Franche C., *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer to *Casuarina glauca*, a tropical nitrogen-fixing tree. *Plant Science* 118: 57-69, 1996.

Reddy, P.R.R.; Das, N.D.; Sankar, G.R.M.; Girija, A.. Genetic parameters in winter sorghum (*Sorghum bicolor*) genotypes associated with yield and maturity under moisture stress and normal conditions. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 66 (11) Nov 661-664, 1996.

Reza Saleki, Paul G. Young and Daniel Lefebvre. Mutants of *Arabidopsis thaliana* capable of germination under saline conditions. *Plant Physiology* 10: 839-845, 1993.

Richard, L.A. *Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos*. México, Limusa, 1977.

Robert Manuel L. et. al. *El cultivo de Tejidos de México*. Centro de Investigación Geográfica de Yucatán, A.C. y CONACYT, 1985.

Rzedowski J. *Flora Fanerogámica del Valle de México*. Vol. I. Edit. Continental., 1979.

Safarejad, A.; Collin, H.A.; Bruce, K.D.; Mcneilly, T. Characterization of alfalfa (*Medicago sativa* L) following in vitro selection for salt tolerance. *Euphytica* 92 (1-2), pags 55-61, 1996.

Salisbury F.B. y Ross C.W. *Fisiología Vegetal* 4ª edición en Inglés 1ª traducción al Español. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. de C.V., 1996.

Skoog, F. and D.J. Armstrong. Cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology*. 21: 359-384., 1970.

Skoog, F. and N.J. Leonard. Sources and structure: Activity relationships of cytokinins. 1-18 in F. Wightman and G. Setterfield (eds.), *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*. Runge Press, Ottawa, Canada, 1968.

Thiyagarajah Meera, S.C. Fry and A.R. Yeo. In vitro salt tolerance of cell wall enzymes from halophytes and glycophytes. *Journal of Experimental Botany* 47 (304): 1717-1724, 1996.

Vázquez C. y Batis A.I. La restauración de la vegetación. árboles exóticos vs. árboles nativos. *CIENCIAS* num. 43 julio-septiembre: 16-23, 1996.

Vucich, V.A. Gasser, C.S. Novel structure of a high molecular weight FK506 binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & General Genetics* 252 (5) oct. 16 pags. 510-517, 1996

Waisel Y.: *Biology of Halophytes*. Academic Press Inc., 1972.

Weimburg, G.R. Lerner and M.A. Haskajoff. Changes of growth and water soluble concentrations in *Sorghum bicolor* L. Moench stressed with sodium and potassium salts. *Plant Physiology* 62. 472-480, 1988

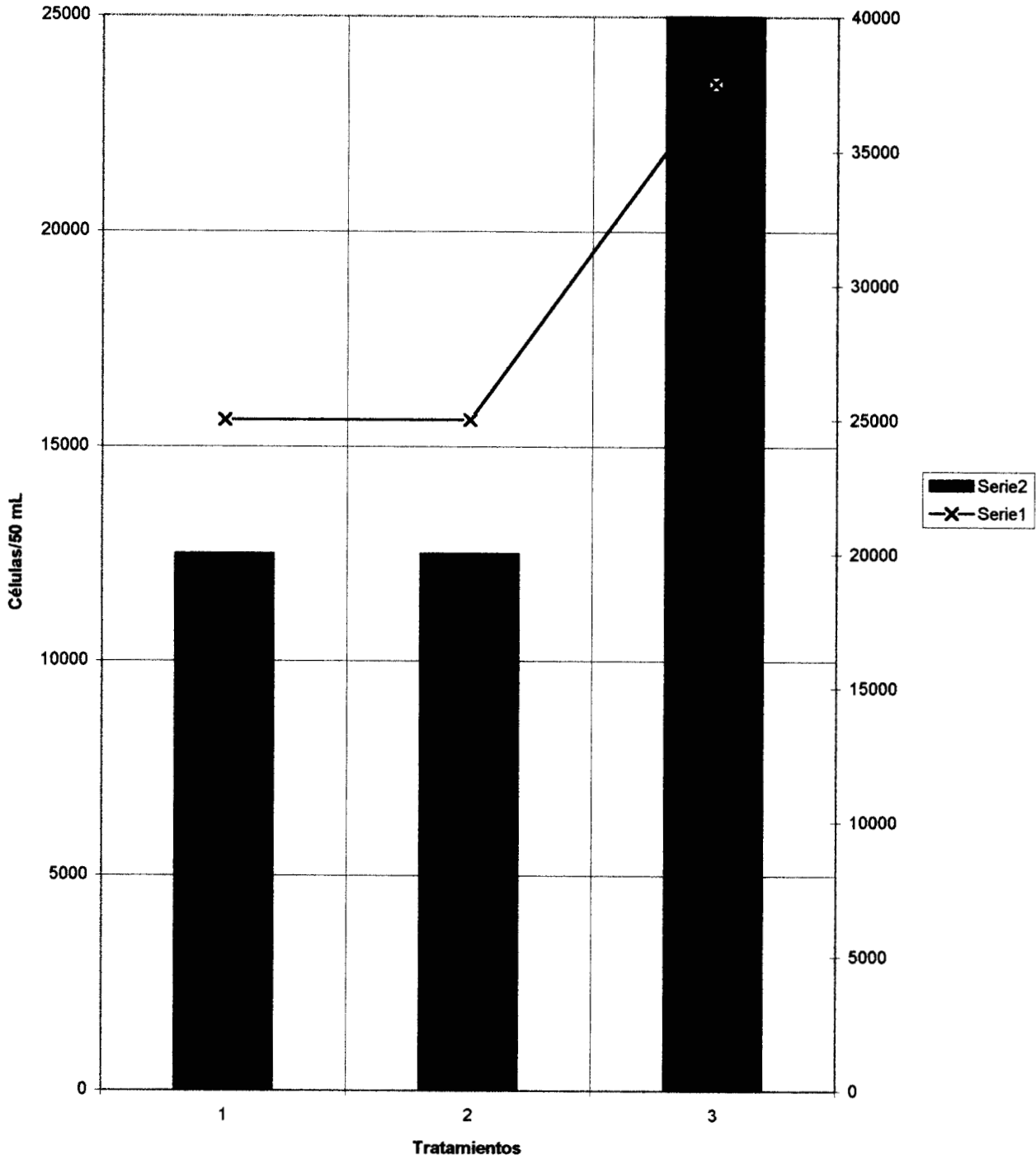
Zhang S. Zhong H. and Sticklen M.B. Production of Multiple Shoots from Shoot Apical Meristems of Oat (*Avena sativa* L.) *Journal of Plant Physiology*

148: 667-671, 1996.

Zidan, I.B.H. Azazeith and P.M. Neumann. Does salinity inhibit maize leaf growth by reducing tissue concentrations of essential mineral nutrients?. *Plant Nutrition* 14 (2), 1407-1419, 1992.

Anexo 1.

Gráfico de testigos



12500	25000 testigo
12500	25000 testigo
25000	37500 testigo
25000	125000 B5-10
7500	250000 B5-11
50000	62500 B5-12
12500	62500 B5-12
12500	175000 B5-12

CELULAS /50 mL. EN LOS TRATAMIENTOS

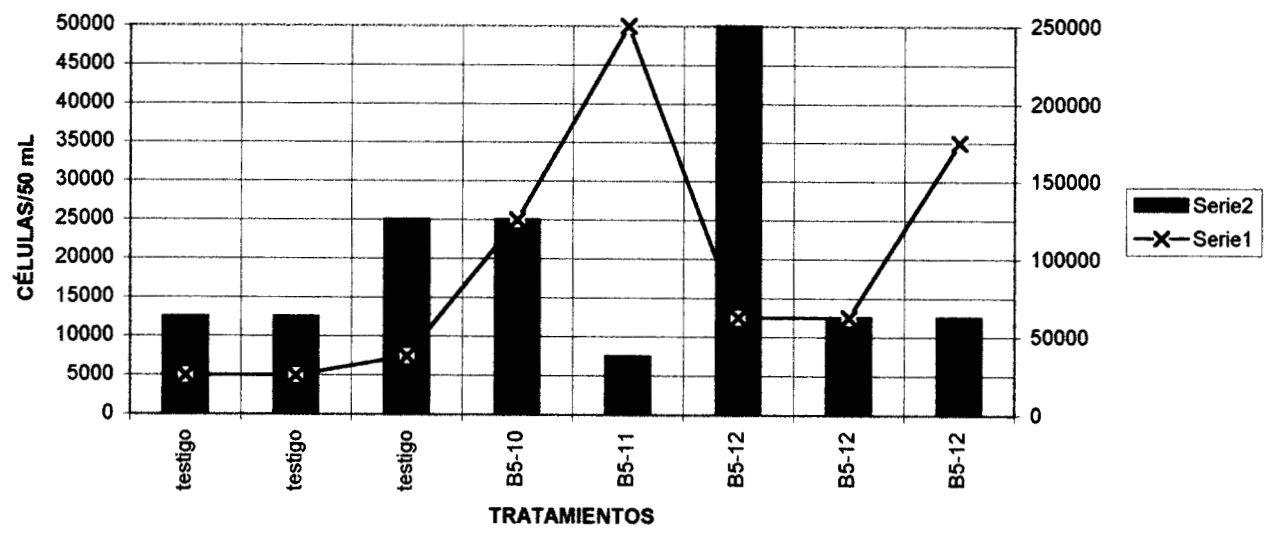
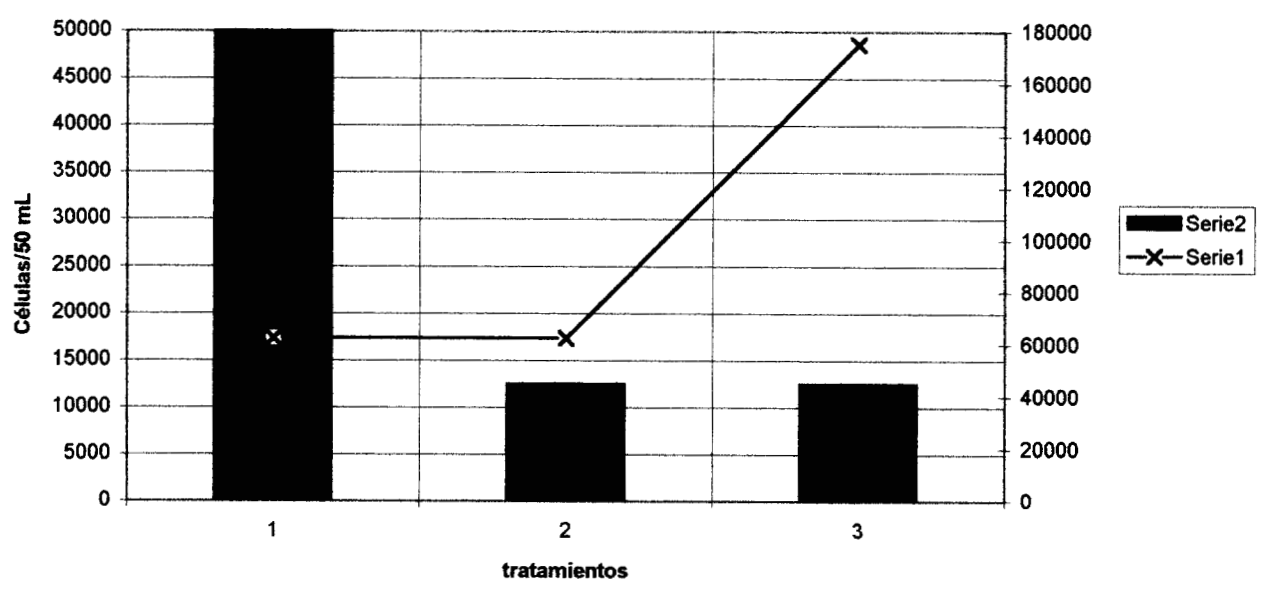


Gráfico de tratamiento B5-12



Fitorreguladores mayormente utilizados en medios Nutritivos.

Regulador	M _r	Concentración (μM)	Preparación de Solución Stock	Coemntarios
Auxinas				
Acido p-cloroacético (pCPA)	186.6	0.1-10.0	Las auxinas son usualmente disueltas en una solución de NaOH	El AIA puede ser oxidado por las células vegetales. Rara vez se usa como única auxina en el medio
Acido 2,4-diclorofenoxi acético (2,4-D)	221.0	0.1-10.0		
Ácido indol-3-acético (AIA)	175.2	0.1-10.0		
Ácido indol-3-butírico (AIB)	203.2	0.1-10.0		
Acido-1-naftalenacético (ANA)	186.2	0.1-10.0		
Ácido β-naftoxiacético (NOA)	202.2	0.1-10.0		
Citocininas				
6-Bencilaminopurina (BAP)	225.2	0.1-10.0	Las citocininas se disuelven usualmente en una solución de NaOH ó en EtOH acuoso	
n-Isopentenilaminopurina (2iP)	203.2	0.1-10.0		
6-Furfurilaminopurina (Cinetina, K)	215.2	0.1-10.0		
Zeatina (Zea)	219.2	0.1-10.0		LA ZEATINA ES TERMOLÁBIL Y POR LO TANTO NO DEBE SER AUTOCLAVEADA
Giberelinas				
Ácido giberélico (GA ₃)	346.4	0.1-5.0	Soluble en H ₂ O	GA ₃ ES TERMOLÁBIL, NO DEBE SER AUTOCLAVEADA. Raramente es necesario para la iniciación o mantenimiento de cultivos de callo ó células en suspensión. En ocasiones es necesario para la regeneración de plántulas

Modificado de Atkinson y Mavituna, 1991

Composición de algunos Medios Nutritivos Para Cultivo de Tejidos Vegetales.

Constituyentes	Heller (1953)	Nitsch and Nitsch (1956)	White (1963)	Hildebrandt <i>et. al.</i> (1962)	Murashige and Skoog (1962)	Gautheret (1942)	White (1943)	Gamborg <i>et. al.</i> (1968)
Macronutrientes								
KCl	750.0	1500.0	65.0	65.0			65.0	
NaNO ₃	600.0							
MgSO ₄ . 7H ₂ O	250.0	250.0	720.0	180.0	370.0	125.0	360.0	250.0
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	125.0	250.0	16.5	33.0			16.5	150.0
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	75.0				440.0			150.0
KNO ₃		2000.0	80.0	80.0	1900.0	125.0	80.0	2500.0
CaCl ₂		25.0						
Na ₂ SO ₄			200.0	800.0			88.0	
(NH ₄) ₂ SO ₄								134.0
NH ₄ NO ₃					1650.0			
KH ₂ PO ₄					170.0	125.0		
Ca(NO ₃). 4 H ₂ O			300.0	400.0		500.0	200.0	
Micronutrientes								
NiSO ₄						0.0500		
FeSO ₄ . 7 H ₂ O					27.8100	0.0500		27.8100
MnSO ₄ . H ₂ O								10.0000
MnSO ₄ . 4H ₂ O	0.0100	3.0000	7.0000	4.5000	22.3000	3.000		
MnCl ₂ . 4 H ₂ O							4.5000	
KI	0.0100		0.7500	3.0000	0.8300	0.5000	0.7500	0.7500
NiCl ₂ . 6H ₂ O	0.0300							
CoCl ₂ . 6 H ₂ O					0.0250			0.0250
Ti(SO ₄) ₃						0.2000		
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	1.0000	0.5000	3.0000	6.0000	8.6000	0.1800	1.5000	2.0000
Zn.Na ₂ EDTA								
Na ₂ EDTA					37.3100			
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0.0300	0.0250			0.0250	0.0500	0.0130	0.0250
BeSO ₄						0.1000		
H ₃ BO ₃	1.0000	0.5000	1.500	0.3800	6.2000	0.0500	1.5000	3.0000
H ₂ SO ₄						1.000		
FeCl ₃ . 6 H ₂ O	1.0000						2.5000	
Na ₂ Mo O ₄ . 2H ₂ O			0.0250		0.2500			0.2500
H ₂ MoO ₄							0.0017	
AlCl ₃	0.0300							
Fe(SO ₄) ₃			2.5000					
Tartrato férrico				40.0000				
Constituyentes Orgánicos								
Sacarosa	20.0	34.00	20.00	20.00	30.00	30.00	20.00	20.00
Glicina			3.00	3.00	2.00	3.00	3.00	
AIA					100.00		100.00	100.00
mio-inositol		0.18			1.0-30.0		2.0	
Cisteína			1.00			10.00		
Vitamina B1	1.00		0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	10.00
Vitamina B6			0.10		0.50	0.10	0.10	0.10
Ac. nicotínico			0.50		0.40	0.50	0.50	
Ac. pantoténico			1.00					
2,4-D			6.00					0.10
ANA								
Cinetina					0.04-10.00			0.10

Concentración expresada en mg l⁻¹, excepto la sacarosa la cual se expresa en g l⁻¹

Modificado de Atkinson y Mavituna, 1991

Historia de la Biotecnología Vegetal (1a parte).

Año Descubrimiento

- 1892 -Se establece la habilidad de las plantas para sintetizar sustancias formadoras de órganos, que tienen una distribución polar.
- 1902 -Primer intento para cultivar tejidos vegetales .
- 1904 -Primer intento para cultivar embriones de crucíferas.
- 1909 -Fusión de protoplastos vegetales (infructuoso).
- 1922 -Germinación asimbiótica *in vitro* de orquídeas.
-Cultivo *in vitro* de ápices radiculares.
- 1925 -Cultivo de embriones aplicado a cruces interespecíficas de *Linum*.
- 1929 -Cultivo de embriones de *Linum* para evitar incompatibilidad en el cruzamiento
- 1934 -Intentos fallidos para cultivar *in vitro* tejido cambial de algunos árboles y arbustos (fallaron debido a la carencia de auxina, la cual aún no había sido descubierta).
Cultivo exitoso de raíces de *Lycopersicon sculentum*.
- 1936 -Cultivo exitoso de varias gimnospermas.
- 1939 -Cultivos de callo de crecimiento continuo.
- 1940 -Cultivo *in vitro* de tejido cambial de *Ulmus* para el estudio de formación de brotes adventicios.
- 1941 -Uso de agua de coco para cultivar embriones de *Datura*.
-Cultivo *in vitro* de tejidos de la agalla de la corona.
- 1944 -Cultivo *in vitro* de tabaco usado para el estudio de la formación de ápices adventicios.
- 1945 -Cultivo *in vitro* de ápices del tallo de *Asparagus*.
- 1946 -Primeras plantas de *Lupinus* y *Trapaeolum* obtenidas por el cultivo del brote apical.
- 1948 -Formación de brotes y raíces adventicias de *Nicotiana tabacum* determinada por la relación auxina/adenina.
- 1950 -Regeneración de órganos a partir de callos de *Sequoia sempervirens*.
- 1952 -Dalias libres de virus obtenidas por el cultivo de meristemas.
-Primera aplicación de microinjertos.
- 1953 -Callos haploides de *Ginko balboa*.
- 1954 -Monitoreo en cambios de cariología y comportamiento cromosómico de cultivos de endospermo de *Zea mays*.
-Primera planta cultivada a partir de una sola célula.
- 1955 -Descubrimiento de la cinetina.
- 1956 -Crecimiento exitoso de células en suspensión para la producción de metabolitos secundarios.
- 1957 -Regulación de de la formación de órganos (raíces y brotes) por el cambio en la relación citocinina/auxina.
- 1958 -Regeneración *in vitro* de embriones somáticos a partir de la nucela de óvulos de *Citrus*.

Historia de la Biotecnología Vegetal (2a parte).

Año Descubrimiento

- 1960 -Éxito en la fertilización *in vitro* de *Papaver rhoeas*.
-Degradación enzimática de paredes celulares para obtener grandes cantidades de protoplastos.
-Propagación vegetativa de orquídeas por cultivo de meristemos.
-Filtración de suspensiones celulares y aislamiento de células individuales por plaqueo.
- 1962 -Desarrollo del medio Murashige y Skoog (MS).
- 1964 -Plantas haploides de *Datura* producidas por granos de polen.
-Regeneración de brotes y raíces sobre callos de *Populus tremuloides*.
- 1965 -Inducción de la floración de cultivos *in vitro* de *Nicotiana tabacum*.
-Diferenciación de plantas a partir de células aisladas en microcultivo.
- 1967 -Inducción floral en *Lunaria annua* por vernalización *in vitro*.
- 1969 -Análisis citológico de plantas regeneradas a partir del cultivo de callo de *Nicotiana tabacum*.
- 1970 -Selección de mutantes bioquímicos *in vitro*.
-Cultivo de embriones utilizado en la producción de monploides de centeno
-Fusión de protoplastos.
- 1971 -Regeneración de plantas a partir de protoplastos.
- 1972 -Hibridación interespecífica a través de fusión de protoplastos entre dos especies de *Nicotiana*.
- 1973 -Rompimiento de la latencia por citocininas en explantes de capítulo de *Gerbera*.
- 1974 -Inducción de ramificación axilar por citocininas en brotes apicales aislados de *Gerbera*.
-Plantas haploides de *Petunia hybrida* regeneradas a partir de protoplastos.
-Híbridos obtenidos por fusión de protoplastos haploides.
-Establecimiento del plásmido Ti como el agente inductor de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*.
- 1975 -Selección positiva de cultivos de callo de *Zea mays* resistentes a *Helminthosporium maydis*.
- 1976 -Iniciación de brotes a partir de ápices criopreservados de *Dianthus caryophyllus*.
-Hibridación vegetal interespecífica por fusión de protoplastos entre *Petunia hybrida* y *P. parodii*.
-Se establece que la síntesis y degradación de opinas es controlada por el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.
- 1977 -Integración del DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.
- 1978 -Hibridación somática entre *Lycopersicon sculentum* y *Solanum tuberosum*.
- 1979 -Cocultivo para transformación genética de protoplastos vegetales con *Agrobacterium tumefaciens*.

Historia de la Biotecnología Vegetal (3a parte).

Año Descubrimiento

- 1980 -Inmovilización de células usadas para la biotransformación de digitoxina en dioxina.
- 1981 -Se introduce el término "variación somaclonal".
-Aislamiento de células auxótrofas por tamizado a gran escala de colonias celulares derivadas de protoplastos haploides de *Nicotiana plumbaginifolia* tratados con mutágenos.
- 1982 -Incorporación de DNA en protoplastos lo que conduce a transformación genética con DNA aislado.
- 1983 -Hibridación citoplásmica intergenérica entre *Rhaphanus sativus* y *Brassica napus*.
- 1984 -Transformación de células vegetales con DNA plasmídico.
- 1985 -Discos de hoja infectados y transformados con *Agrobacterium tumefaciens* y la regeneración subsecuente de plantas transformadas.

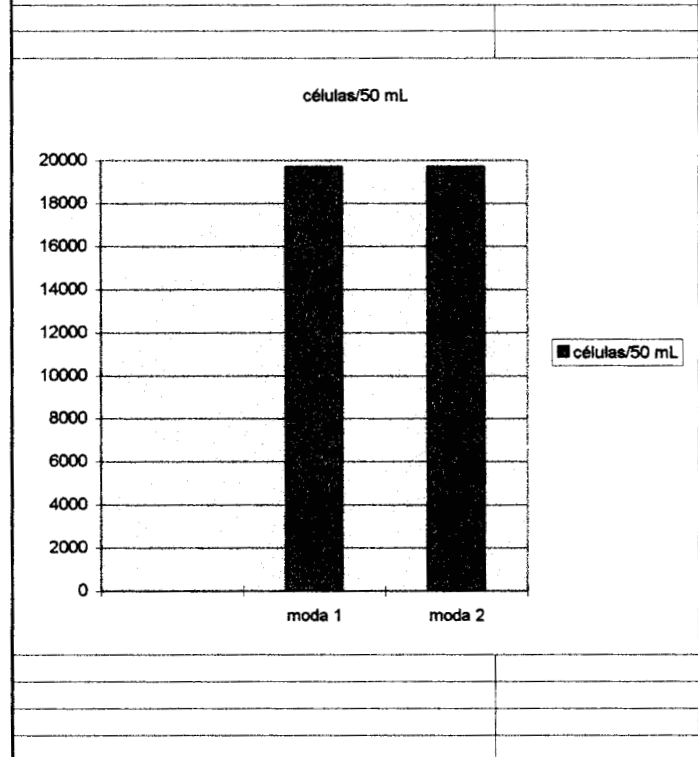
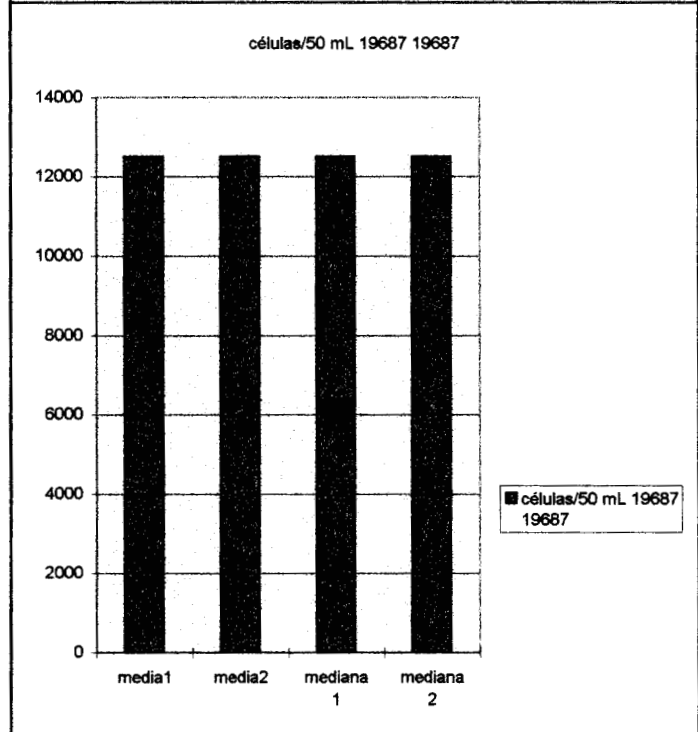
Modificado de Atkinson y Mavituna, 1991.

Comparación de la efectividad y Propiedades de los agentes esterilizantes

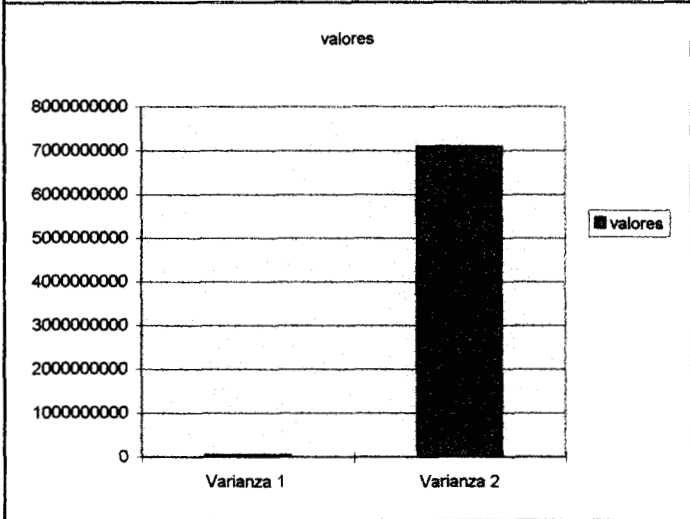
Agente esterilizante	Concentración usada	Facilidad para su eliminación	Tiempo de Esterilización (min.)	Efectividad
Hipoclorito de Calcio	9-10%	+++	5-30	Muy bueno
Hipoclorito de Sodio	2%	+++	3-50	Muy buenos
Peróxido de Hidrógeno	10-12%	++++	5-15	Bueno
Agua brominada	1-2%	+++	2-10	Muy bueno
Nitrato de Plata	1%	+	5-30	Bueno
Cloruro mercúrico	0.1-1%	+	2-10	Satisfactorio
Antibióticos	4-50 mg l ⁻¹	++	30-60	Muy bueno

Modificado de Atkinson y Mavituna, 1991.

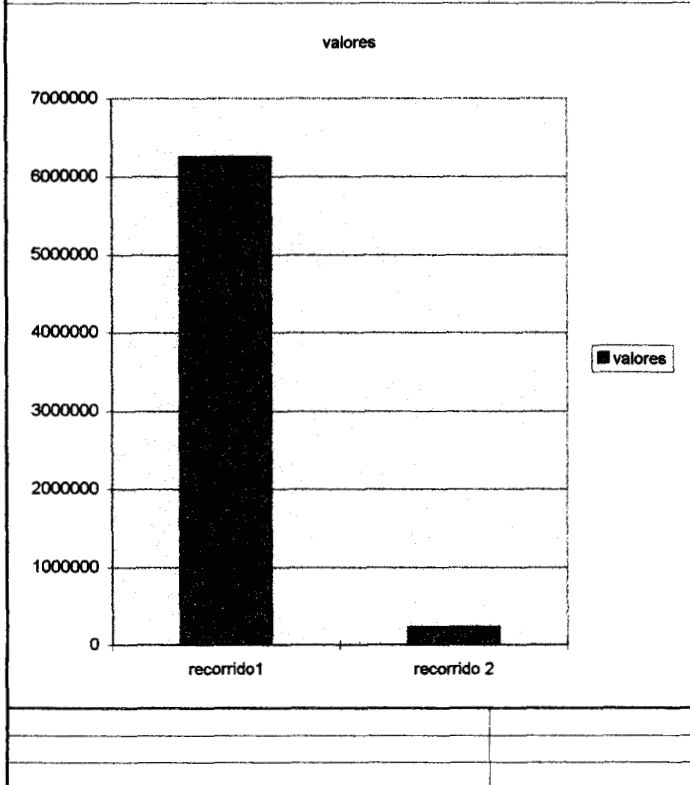
MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL	células/50 mL
moda 1	19687
moda 2	19687
media1	12500
media2	12500
mediana 1	12500
mediana 2	12500



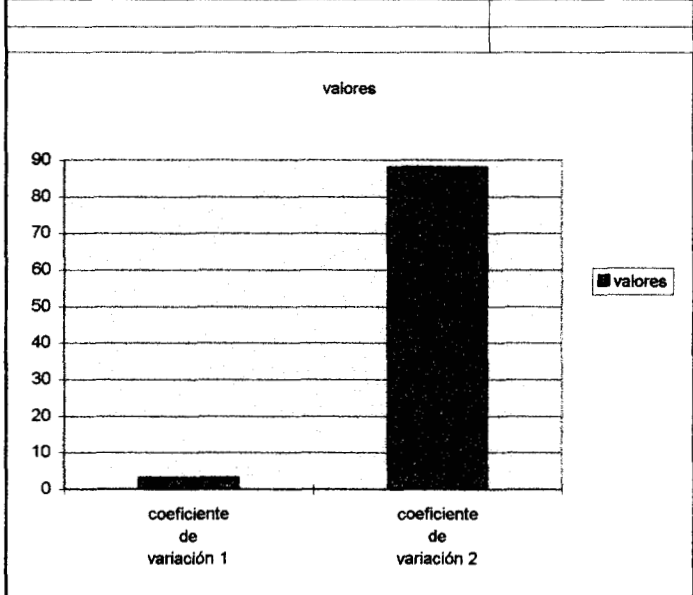
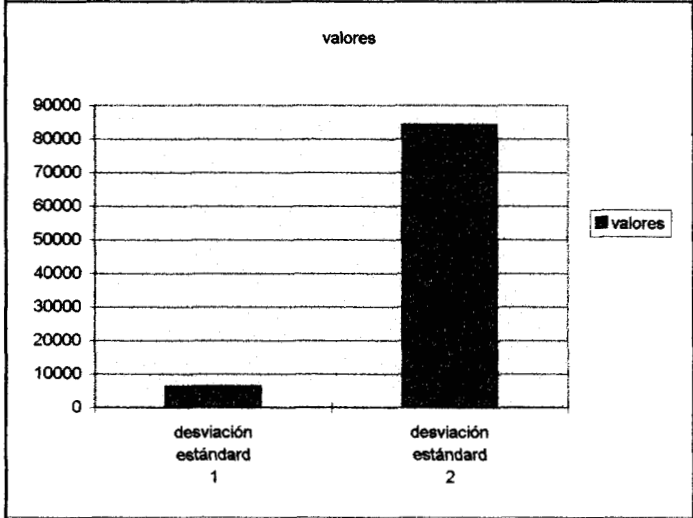
MEDIDAS DE DISPERSIÓN	
Varianza 1	37591919
Varianza 2	7082908550



MEDIDAS DE DISPERSIÓN		valores
recorrido1	6250000	6250000
recorrido 2	225000	225000



MEDIDAS DE DISPERSIÓN	valores
desviación estándar 1	6131
desviación estándar 2	84160



MEDIDAS DE DISPERSIÓN	valores
coeficiente de variación 1	3
coeficiente de variación 2	88

nexo 2

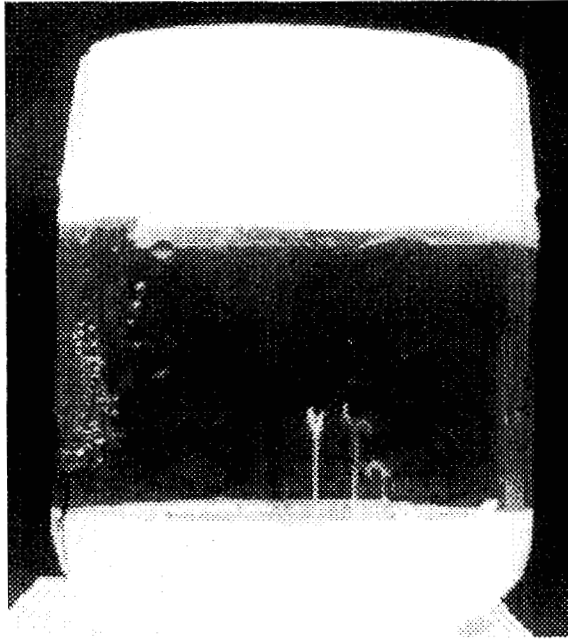


Figura 5. Germinación *in vitro* de semillas de *S. diffusa* en medio B5 sin reguladores del crecimiento vegetal ajustado a pH de 8.5

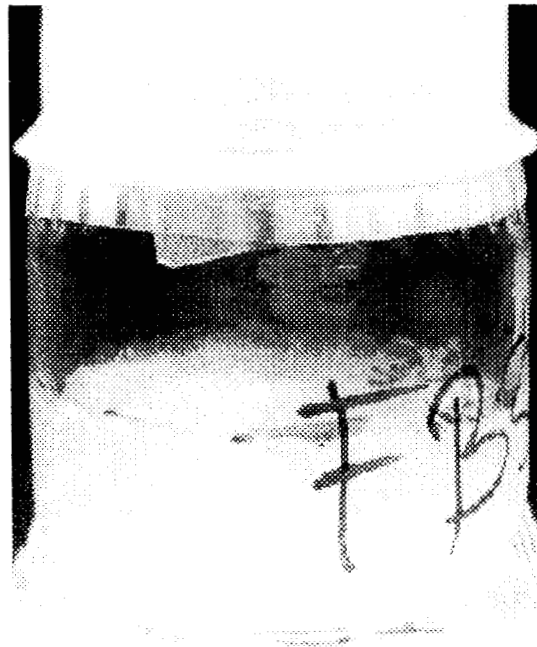


Figura 6. Expiante foliar de *S. diffusa* sembrado en el tratamiento B5-4



Figura 7. Callo de *S. diffusa* inducido en el tratamiento B5-4

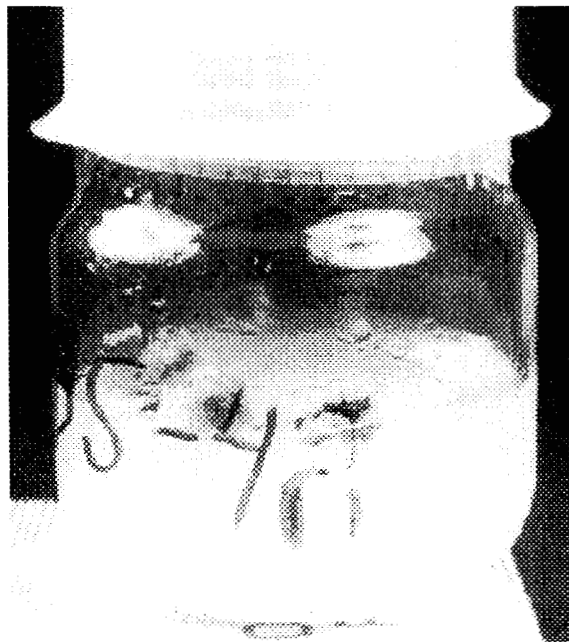


Figura 8. Callo de *S. diffusa* inducido en el tratamiento B5-4