

Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Iztapalapa

“Efecto del ácido 2,4,5,-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) en cultivos
in vitro de mezquite (*P. laevigata*)”

T E S I S I N A

Que para obtener el grado de Especialización en Biotecnología

P R E S E N T A

IBI. Kimi Ehecatl Villanueva Pérez

Asesor

Dr. Francisco Cruz Sosa

México D.F.

Noviembre, 2007

El Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación idónea de los resultados que presentó el alumno: Kimi E. Villanueva Pérez de la Especialización en Biotecnología

Asesor:

Dr. Francisco Cruz Sosa
Departamento de Biotecnología
UAM-Iztapalapa

Lector:

Dr. Juan Orozco Villafuerte
Facultad de Química, Departamento de Alimentos
Universidad Autónoma del Estado de México

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Cruz Sosa por el apoyo, amistad y dirección brindada, para la realización de la Especialización.

A I A. Claudia Angélica Oriza Barranco por su apoyo y comprensión incondicional en dicha especialidad.

INDICE

1. RESUMEN.....	2
1.1 ANTECEDENTES	2
1.2 JUSTIFICACIÓN	4
2. INTRODUCCIÓN.....	7
3. HIPOTESIS.....	8
4. OBJETIVO GENERAL.....	8
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	9
5. METODOLOGIA.....	9
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
7. CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSIÓN	14
8. CONCLUSIONES.....	16
8.1 RECOMENDACIONES	16
9. BIBLIOGRAFIA	17
10. ANEXOS.....	19

1. Resumen

La auxina 2,4,5-T es un regulador empleado en cultivos *in vitro* de especies vegetales, en cultivos silvestres de *P. laevigata* se ha demostrado su capacidad de inducir la formación de goma en especímenes adultos. El objetivo del presente trabajo es evaluar la capacidad morfogénica de este regulador en cultivos *in vitro* de *P. laevigata*. Explantes nodales, provenientes de plantas de 4 años de edad, fueron empleados para iniciar el cultivo, sembrados en medio MS suplementado con 2,4,5-T (0.0-50.0 mg/L). Las respuestas morfogénicas observadas fueron la formación de brotes, callo y goma. El callo se produjo en todos los tratamientos, con excepción del testigo, el cual presentaba una coloración blanquecina de apariencia esponjosa. Se observaron diferencias en la cantidad de callo formado, encontrándose la mayor producción en los cultivos con 20 mg/L de 2,4,5-T. Los brotes se produjeron en los tratamientos conteniendo bajas concentraciones de 2,4,5-T y en ausencia del regulador, siendo significativamente mayor el número de brotes por explante (3.1) en presencia de 1.0 mg/L de 2,4,5-T. El exudado se formó en el tratamiento con 1.0 mg/L de 2,4,5-T produciéndose en el 30% de los cultivos. El exudado fue analizado cualitativamente arrojando una prueba positiva para goma.

1.1 Antecedentes

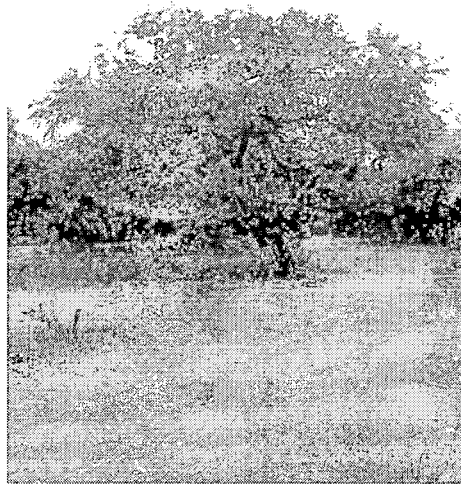
Producción de gomas vegetales por cultivo de tejidos vegetales

A partir de cultivos de callo de *Acacia senegal*, Mollard y Joseleau (1994), establecieron cultivos de células en suspensión con el objetivo de verificar si las células cuando son cultivadas *in vitro* retienen su habilidad de secretar goma arábica. Encontrando que de manera natural las células en suspensión de *Acacia senegal*, secretan al medio de cultivo algunas moléculas con características químicas comunes a los constituyentes estructurales de la goma arábica.

Sin embargo, estos resultados no son los suficientemente contundentes como para afirmar que las células en suspensión retienen su habilidad de exudar goma verdadera. Al parecer el trabajo de Mollard y Joseleau es el único antecedente sobre la producción de goma arábica y otras gomas vegetales por CTV.

En lo que concierne a la goma de mezquite, se han utilizado dos diferentes reguladores del crecimiento vegetal (ácido 2-cloroetilfosfónico (ethephon) y ácido 2,4,5,-triclorofenoxiacético (2,4,5-T)) para inducir la producción de goma en árboles de *Prosopis glandulosa*. Sin embargo, el efecto de estos reguladores sobre la inducción de gomosis no fue estudiado en cultivos *in vitro*. Greenwood y Morey (1979), elaboraron soluciones de 50, 250 y 1,000 ppm de ethephon y 3,000 ppm de 2,4,5-T y asperjaron árboles silvestres de *P.glandulosa* con estas soluciones

durante 3 años. Pasado este tiempo realizaron cortes transversales a diferentes tallos de estas plantas, observando la formación y acumulación de goma en los tejidos internos. También reportaron que en un lote de árboles a los que no se les trató con los reguladores no presentó la formación de goma.



Recientemente Orozco y colaboradores (2003 y 2005), lograron producir goma de mezquite en cultivos *in vitro*, empleando como explantes segmentos nodales de *P. laevigata*. Este grupo de investigadores implementaron la estrategia conocida como elicitación, utilizando elicitores bióticos y físicos. El presente trabajo tiene como finalidad dar continuidad a dichos trabajos, implementando en esta ocasión el uso de elicitores físicos como lo es el 2,4,5-T.

1.2 Justificación

El consumo mundial anual promedio de goma arábica durante los últimos 20 años ha fluctuado alrededor de los 75 millones de Kg. El costo promedio actual es de \$ 6.00 USD. Diversos factores político-sociales producen fluctuaciones cíclicas en la provisión de la goma arábica debido a que toda la producción proviene de la zona del Sahel que comprende a los países que circundan al desierto del Sahara (Williams y Phillips, 2000), en donde frecuentemente ocurren hambrunas debido a guerras tribales y sequías.

Esta situación provoca que las poblaciones de estas zonas limítrofes al desierto del Sahara recurran al sobrepastoreo y por consiguiente a la tala de las acacias que exudan la goma.



El desabasto de la goma arábica produce crisis recurrentes entre los industriales de nuestro país y del resto del mundo, ya que en nuestro caso, su precio en el mercado se eleva debido a la fluctuación del peso con respecto al dólar y a los procesos inflacionarios. A los industriales les resulta difícil sustituir su funcionalidad con otros biopolímeros, tal como los almidones modificados ya que este último proceso involucra la reformulación de los procesos y productos en la cadena de producción, estos cambios en los procesos manufactureros son muy complicados ya que se puede correr el riesgo de que el consumidor rechace el producto final al percibir cambios en sus atributos sensoriales. Esta situación ha conducido a la búsqueda de sustitutos con una funcionalidad parecida (Anderson y Farquhar, 1982; Garti et al., 1999; Vernon-Carter et al., 2000; Vernon-Carter, 2001).

Hasta 1990 sólo se permitía la utilización en alimentos y productos farmacéuticos de tres gomas vegetales, la goma de tragacanto, la goma karaya y la goma arábica.

Debido a esto y habiendo un número más diverso de especies productoras de goma, surge la necesidad de estudiar y caracterizar química y fisicoquímicamente algunas gomas alternativas a las permitidas para su posible uso y para facilitar su detección en envíos comerciales de goma. Contando con el antecedente de que dichas gomas han sido usadas de formas diversas en sus países de origen (Anderson y Weiping, 1990; Garti et al., 1999; Vernon-Carter et al., 2000).



La goma de mezquite ha sido utilizada durante cientos de años por las comunidades indígenas de las zonas áridas y semiáridas de México y del Suroeste de los Estados Unidos en una variedad de maneras como lo son para curar ojos inflamados, dolores de garganta, como golosina, como espesante y como alimento para animales.

Más recientemente se sabe que pequeñas industrias artesanales que producen alimentos y dulces la emplean (INIREB, 1976; Felker y Bandurski, 1979).

Estudios hechos por investigadores de la UAM-I indican que las aplicaciones y propiedades funcionales de la goma de mezquite son debidas a su habilidad emulsificante, a su capacidad de formar películas, y a su propiedad de formar soluciones acuosas de muy baja viscosidad aún a concentraciones tan altas como del 50% en peso. Estas características le brindan un carácter notable con grandes

posibilidades de explotación, semejantes a las de la goma arábica (Vernon-Carter et al., 2000).

Sin embargo, no existe un suministro controlado de la goma de mezquite ya que todos los árboles son silvestres y están sujetos a una sobreexplotación intensiva, al punto de que varios especialistas han dicho que la especie de mezquite que produce la goma esta a punto de extinción con el consecuente impacto ecológico resultante. Ante esta situación la presente investigación tuvo como uno de sus principales objetivos la producción de goma de mezquite a través de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

De alcanzarse dicho objetivo, se estaría generando conocimiento sobre los factores que inducen su producción, sus mecanismos de control, y a futuro generar una serie de procedimientos para el aprovechamiento de este recurso natural hasta ahora subexplotado.

2. Introducción.

Cultivo de tejidos vegetales (CTV)

El termino CTV se refiere al cultivo *in vitro* de cualquier estructura viva de una planta, sean estas, células, un tejido o un órgano, bajo condiciones asépticas. El principio del CTV es simple: Primero, es necesario aislar una parte de una planta, a la que se denomina "explante", este explante posee una potencialidad de diferenciación capaz de regenerar no solo tejidos y órganos, sino también un individuo completo; segundo, se provee de un medio ambiente apropiado (medio de cultivo adecuado a condiciones físicas propias de la especie, en el cual pueda expresar su potencial intrínseco o inducido) y tercero, el trabajo es realizado en condiciones asépticas, es decir, el medio de cultivo ésta libre de microorganismos contaminantes (Abdelnour y Vincent, 1994; Pierik, 1990).

El CTV se define como un conjunto de técnicas con las cuales se puede ejercer un control relativo sobre los procesos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos bajo estudio (Abdelnour y Vincent, 1994).

La técnica del CTV son también un conjunto de tecnologías que ofrecen amplias perspectivas a los países en desarrollo, gracias a su gran potencial como medio de

propagación de cultivos económicamente importantes o de cultivos con un potencial a futuro sobre bases o fines económicos.

Lo anterior deriva, de las diversas ventajas que ofrecen tales tecnologías (Evans y Flick, 1981; Robert y Loyola, 1985; Torres, 1989).

Cultivo de segmentos nodales

Con este nombre se conoce al aislamiento de una yema, junto con una porción de tallo, para obtener un vástago a partir de la yema. Este es el método más socorrido de propagación vegetativa de las plantas *in vitro*, ya que también puede aplicarse *in vivo*. Cada una de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas, idénticas a la del ápice del tallo, pueden ser aisladas sobre un medio nutritivo, intentándose así su desarrollo *in vitro*. Cuando se obtienen un número suficientemente grande de vástagos, éstos son enraizados, realizándose finalmente la transferencia al suelo (Pierik, 1990).

3. Hipótesis

El empleo de reguladores del crecimiento vegetal en bajas concentraciones promueve fenómenos morfogénéticos en cultivos *in vitro*, así mismo, la utilización de concentraciones altas resulta en efectos herbicidas en muchos casos. Siendo el ácido 2,4,5- triclorofenoxiacético un regulador del crecimiento, al utilizarse en concentraciones adecuadas podría actuar como un elicitador químico y promover la producción de goma de mezquite en cultivos *in vitro* de *Prosopis laevigata*.

4. Objetivo General

Evaluar el efecto del ácido 2,4,5,-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) en cultivos *in vitro* de explantes nodales de mezquite (*P. laevigata*)

4.1 Objetivos particulares

- ☼ Evaluar el efecto morfogenético del ácido 2,4,5,-triclorofenoxiacético en cultivos *in vitro* de segmentos nodales de *P. laevigata*.

- ☼ Estudiar el posible efecto elicitor del ácido 2,4,5,-triclorofenoxiacético sobre la producción de goma de mezquite.

5. Métodos

Se tomaron como explantes segmentos nodales del tallo de 5-6 cm de longitud provenientes de plantas cultivadas en el invernadero con una edad promedio de 4 años (figura 1).

Los explantes se lavaron con detergente y agua corriente, posteriormente dentro de una campana de flujo laminar fueron desinfectados sumergiéndolos en una solución de etanol al 70% en agitación constante durante un min. Una vez drenado el alcohol, los explantes se volvieron a desinfectar sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador doméstico) al 100% en constante agitación durante 10 min. Finalmente se aplicaron tres enjuagues de un minuto cada uno con agua destilada esterilizada.

Concluida la desinfección, los explantes se sembraron en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 30 g/L de sacarosa, 1.6 g/L de L-glutamina, 50 mg/L de ácido ascórbico, 100 mg/L de ácido cítrico, 2 g/L de phytigel como gelificante y diferentes concentraciones de ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (tabla 1). El pH del medio fue ajustado a 5.7-5.8 antes de ser esterilizado a 121°C durante 20 min.

Tabla 1. Concentración de regulador utilizada.

2,4,5-T (mg/L)									
0	0.5	1.0	2.0	4.0	5	10	20	40	

Los explantes fueron sembrados verticalmente a una profundidad de 1 cm en tubos de 25 x 150 mm, conteniendo 25 mL del medio de cultivo. Se sembraron 60 explantes por concentración y se incubaron bajo un fotoperiodo de 16 h luz a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

La producción de goma se evaluó cada 7 días hasta completar 5 observaciones. La goma producida se colecto con tubos capilar y se almacenó a -50°C para su análisis posterior.

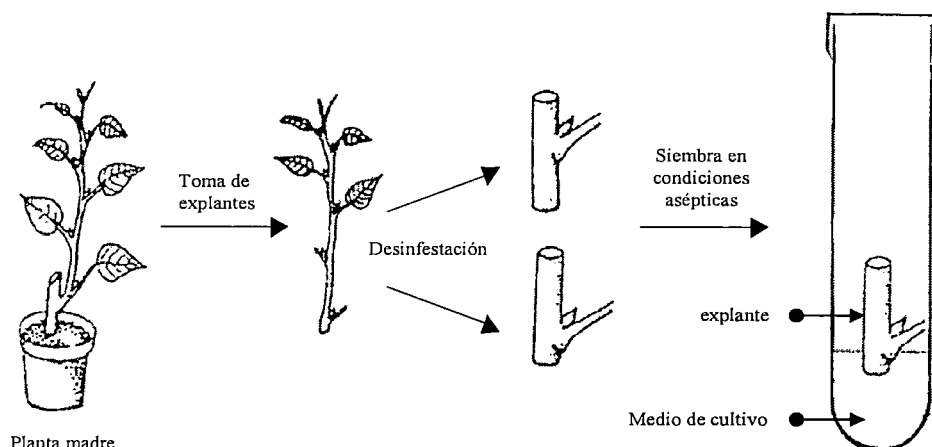


Figura 1 Preparación de explantes nodales (modificado de Pollard y Walker, 1990).

6. Resultados y discusión.

La respuesta morfológica de los explantes nodales de *P. laevigata* a la presencia de 2,4,5-T fue la formación de callo, brotes y un exudado (tabla 2). El callo se produjo en todos los tratamientos, con excepción del testigo, el cual presentaba una coloración blanquecina de apariencia esponjosa cuando tenía pocos días de formación y posteriormente, a los 30 días las características cambiaron, el color exhibido era amarillo y en algunos fragmentos, cercanos al nodo, de color verde, de una textura muy friable y cremosa (Fig. 1a). Se observaron diferencias en la cantidad y tiempo en que se desarrollaba el callo, encontrándose la mayor producción en los cultivos con 20 mg/L de 2,4,5-T formándose a los 20 días. Los brotes se produjeron en los tratamientos conteniendo bajas concentraciones de 2,4,5-T y en ausencia del regulador, siendo significativamente mayor el número de brotes por explante (3.1) en presencia de 1.0 mg/L de 2,4,5-T (Fig. 1b). El exudado solo se formó en el tratamiento con 1.0 mg/L de 2,4,5-T produciéndose solo en el 30% del total de los explantes (Fig. 1c).



Fig 1a. Cultivos *in vitro* de *P. laevigata*. : Callo.



Fig 1b. Cultivos *in vitro* de *P. laevigata*. : Brote.

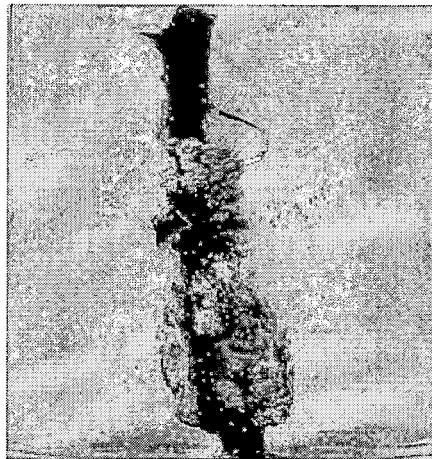


Fig 1c. Cultivos *in vitro* de *P. laevigata*. : Goma.

El exudado fue analizado cualitativamente de acuerdo al Food Chemical Codex (3), arrojando una prueba positiva para goma. Se ha demostrado la capacidad de *P. laevigata* en cultivos *in vitro* para producir goma mediante la aplicación de factores estresantes (4), en la presente investigación también ha sido posible la producción de goma por efecto de 2,4,5-T, aunque la cantidad de goma producida fue sumamente pequeña en comparación a lo reportado en la bibliografía (4).

Tabla 2. Efecto del 2,4,5-T sobre los cultivos de explantes nodales del *P. laevigata*.

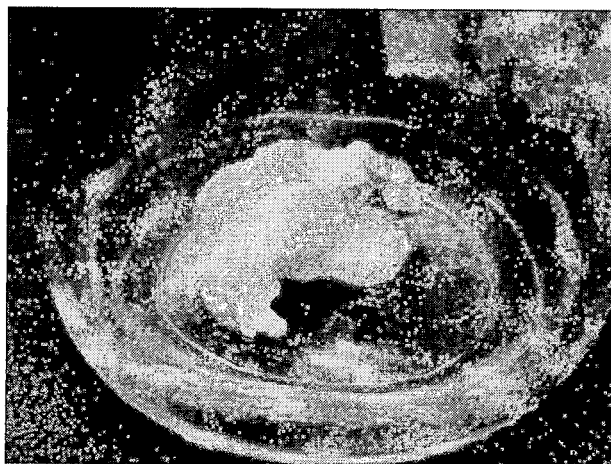
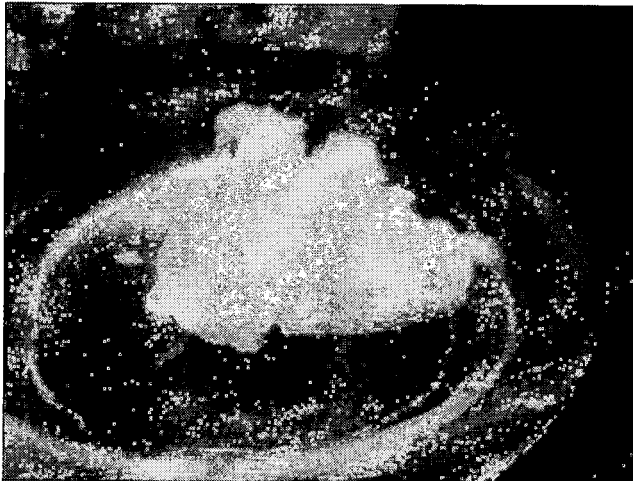
[2,4,5 - T] mg/L	Brotos (%)	Callo (%)	Exudado (%)
0	76 ±1.5	0	0
0.5	45 ±2	69 ±2.5	3 ±1
1	29 ±2.5	84 ±2	24 ±1.5
2	20 ±1	100	30 ±1
4	5 ±1	100	0
5	1 ±1	100	0
10	0	100	0
20	0	100	0
40	0	100	0

Datos tomados transcurridos 45 días de cultivo

Lotes de 30 explantes y 3 repeticiones. Fueron analizados estadísticamente con la Prueba de Tukey (P=0.05)

7. Cultivo de células en suspensión

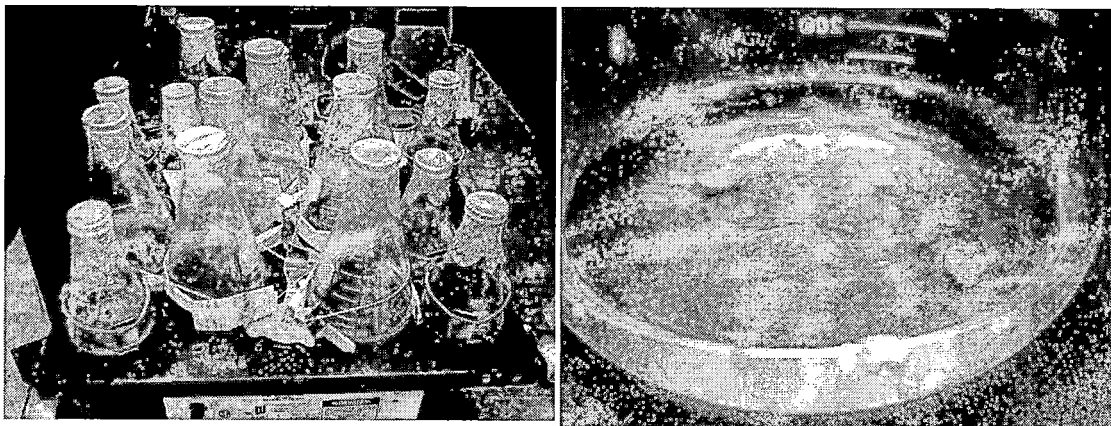
Debido a que una de las respuestas fue la formación de callo, se procedió a subcultivarlo en medio MS con los mismos suplementos que en los tratamientos con explantes pero con ausencia del 2,4,5 T., para fomentar el desarrollo del mismo. Una vez subcultivados los callos se colocaron en condiciones semejantes de incubación; fotoperiodo de 16 h luz a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.



F2. Resiembra del callo

El callo es de apariencia friable, y durante el la incubación se observo la producción de biomasa del mismo, procediendo asi a la producción masiva de callo de *P. laevigata* para el establecimiento de cultivos celulares en suspensión, con el objetivo de obtener una mayor producción del exudado o precursores en este sistema, como lo reportado por Mollard y Joseleau 1994 en cultivos de *Acacia senegal*.

El establecimiento del cultivo de células en suspensión se coloco con medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 30 g/L de sacarosa, 1.6 g/L de L-glutamina, 50 mg/L de ácido ascórbico, 100 mg/L de ácido cítrico. El pH del medio fue ajustado a 5.7-5.8 antes de ser esterilizado a 121°C durante 20 min. Colocados en el orbitador a 110 rpm y registrando resultados cada 5 días en un periodo de 30 días. Esto con el fin de observar el desarrollo de dicho callo en esta técnica.



8. Conclusiones.

En la literatura no existen reportes de regeneración *in vitro* de *P. laevigata* de manera que cualquier esfuerzo que se realice en este ámbito resulta ser un progreso para esta especie económicamente importante. Hasta el momento el 2,4,5-T ha promovido principalmente la formación de callo, pudiendo ser estos resultados importantes en un futuro si es deseable el establecimiento de cultivos de células en suspensión, asociados a la producción de un metabolito secundario como la goma de mezquite. Por otra parte el regulador utilizado no promueve la formación de goma, por lo que su posible efecto promotor de la gomosis no fue establecido, sin embargo, habría que realizar una serie de estudios histológicos para evaluar la posible formación y acumulación de goma en los tejidos internos como lo realizado por Greenwood y Morey (1979) en individuos de *P glandulosa*.

8.1 Recomendaciones.

Realizar las pruebas necesarias para el establecimiento de cultivos de células en suspensión y finalmente realizar análisis histológicos para verificar si hay formación de goma y su acumulación en los tejidos internos.

9. Bibliografía

- Abdelnour, E.A. y Vincent, E.J., 1994. *Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales*. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 38 pp.
- Anderson, D.M.W. y Farquhar, J.G.K., 1982. Gum exudates from the genus *Prosopis*. *The International Tree Crops Journal*, 2, 15-24.
- Anderson, D.M.W. y Weiping, W., 1989. The characterization of proteinaceous *Prosopis* (mesquite) gums which are not permitted food additives. *Food Hydrocolloids*, 3, 235-242.
- Dickinson, E., Galazka, V.B. y Anderson, D.M.W. 1991a. Emulsifying behaviour of gum Arabic. 1. Effect of the nature of the oil phase on the emulsion droplet-size distribution. *Carbohydrate Polymers*, 14: 373-383
- Dickinson, E., Galazka, V.B. y Anderson, D.M.W. 1991b. Emulsifying behaviour of gum Arabic. 2. Effect of the gum molecular weight on the emulsion droplet-size distribution. *Carbohydrate Polymers*, 14: 385-392.
- Evans, D.A. y Flick, C.E., 1981. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. En: *Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture*. Thorpe, A.T. (Ed.). Academic Press. USA. 379 pp.
- Garti, N., Slavin, Y. y Aserin, A., 1999. Surface and emulsification properties of a new gum extracted from *Portulaca oleracea* L. *Food Hydrocolloids*. 13, 145-155.

- Greenwood, C. y Morey, P., 1979. Gummosis in honey mesquite. *Botanical Gazette*, 140:1. 32-38.
- Mollard, A. y Joseleau, J.P., 1994. *Acacia senegal* cells cultured in suspension secrete a hydroproline-deficient arabinogalactan-protein. *Plant Physiology and Biochemistry*. 32:5. 703-709.
- Orozco J., Buendía L., Cruz F., Vernon E.J. 2005 Increased mesquite gum formation in nodal explants cultures after treatment with a microbial biomass preparation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43; 802 – 807.
- Orozco J., Cruz F., Ponce E., Vernon E.J. 2003 Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and from wild trees. *Carbohydrate polymers*. 54, 327 – 333.
- Pierik, R.L.M., 1990. Cultivo *in vitro* de la Plantas Superiores. Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 pp.
- Robert, M.L. y Loyola, V.M., 1985. *El Cultivo de Tejidos Vegetales en México*. CICY-CONACyT, México. pp. 21-26.
- Torres, C.K., 1989. Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. AVI. USA. 285 pp.
- Vernon-Carter, E.J., Beristain, C.I. y Pedroza-Islas, R., 2000. Mesquite gum (*Prosopis* gum). En: *Novel Macromolecules in Food Systems, Developments in Food Science*. Doxastakis, G. y Kiosseoglou, V. (Eds.). Vol. 41. Elsevier. Países Bajos. pp. 217-238.

- Williams, P.A. y Phillips, G.O., 2000. Gum arabic. En: *Handbook of Hydrocolloids*. Williams, P.A. y Phillips, G.O. (Eds.). CRS Press. Boca Raton, Florida. USA. pp. 155-168.

10. Anexo I. Preparación de medio básico MS (1000mL)

Solución	Volumen (mL)
Agua	400
Macronutrientes	100
Micronutrientes	10
FierroEDTA	5
Vitaminas	10
Sacarosa	30g

Agregar otros componentes (reguladores del crecimiento vegetal, complejos orgánicos, etc.) si se requieren para el experimento, ajustar el pH a 5.8 y aforar a 1000 mL con agua destilada.

Para preparar medio semisólido, agregar agar (0.8%) o phytigel (0.2%). Una vez colocado en recipientes individuales, el medio deberá ser esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 a 20 min. En refrigeración puede conservarse como máximo 2 semanas.

Compuesto	Macronutrientes MS (10x), g/L
KNO ₃	19.00
NH ₄ NO ₃	16.50
MgSO ₄ .7H ₂ O	3.70
CaCl ₂ .2H ₂ O	4.40 CaCl ₂ pesar 3.32 g
KH ₂ PO ₄	1.70
	Micronutrientes MS (100x), mg/100mL
H ₃ BO ₃	620
MnSO ₄ .4H ₂ O	2230 MnSO ₄ .H ₂ O pesar 1.68 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	860
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25
CuSO ₄ .5H ₂ O	2.5
CoCl ₂ .6H ₂ O	2.5
KI	83
	Vitaminas(100x), mg/100mL
Ácido nicotínico	50
Tiamina-HCl	50
Piridoxina-HCl	10
Mio-inositol	1000
Glicina	200

Solución de fierro-EDTA (10x) en 1000mL

1. Disolver 5.57 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 350 mL de agua, aplicando calor si es necesario.
2. Disolver 7.45 g de Na_2EDTA en 350 mL de agua aplicando calor si es necesario.
3. Cuando ambas soluciones se hayan disuelto, combinarlas y aforar a 1000 mL. Conservar en frasco ámbar y refrigeración.
4. Use 5 mL por litro de medio MS.

Reguladores del crecimiento	100 mg/L
2,4-D	5mg disolver en etanol, aforar a 50 mL
Kinetina	5mg disolver en NaOH 1 N, aforar a 50 mL

Para 1000 mL de medio MS-3 agregar 4 mL de 2,4-D y 10 mL de Kinetina, las concentraciones finales en el medio son 2,4-D $1.81 \mu\text{M}$ (0.4 mg/L), Kinetina $4.65 \mu\text{M}$ (1.0 mg/L).