



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



**TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO®**  
Instituto Tecnológico de Tlajomulco



## **TESIS**

**“Propagación *in vitro* de Agrillo (*Rhus allophylloides*) por medio de biorreactores”**

### **PRESENTA:**

**Ing. Mayra Berenice Vega Cervantes**

### **DIRECTOR DE TESIS:**

Dra. Mayra Itzcalotzin Montero Cortés

### **CODIRECTOR DE TESIS:**

Dr. Arturo Moisés Chávez Rodríguez

### **REVISORES DE TESIS:**

Dra. Vania Sbeyde Farias Cervantes

Dra. Irma Guadalupe López Muraira

---

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROBIOTECNOLOGÍA**

---

**TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. NOVIEMBRE, 2020.**



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

DIRECCIÓN  
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, **05/Noviembre/2020**

No. DE OFICIO: DEPI/043/2020

Asunto: Autorización de impresión de tesis.

**ING. MAYRA BERENICE VEGA CERVANTES  
CANDIDATA AL GRADO DE MAESTRÍA  
PRESENTE**

Por este conducto, tengo el agrado de comunicarle que el Comité Tutorial asignado a su trabajo de tesis titulado "Propagación in vitro de Agrillo (*Rhus allophyloides*) por medio de biorreactores", ha informado a esta División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPI), que están de acuerdo con el trabajo presentado. Por lo anterior, se le autoriza a que proceda con la impresión definitiva de su trabajo de tesis.

Esperando que el logro del mismo sea acorde con sus aspiraciones profesionales, reciba un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

*Excelencia en Educación Tecnológica®  
Educando para la Sociedad Actual y los Retos del Futuro*

**DR. MIGUEL ÁNGEL SEGURA CASTRUITA  
JEFE DE LA DEPI**

C.c.p.- L.I. Andrea Torres Rico.-Jefa del Dpto. de Servicios Escolares.  
C.C.P.- Expediente  
C.c.p.- Archivo.  
MASC/mjvs.



## **AGRADECIMIENTOS**

Al proyecto "Evaluación y desarrollo de productos antioxidantes de frutos de agrillo (*Rhus allophylloides*) y su propagación vegetal *in vitro* por medio de un sistema de inmersión temporal" aprobado en la convocatoria 2018-2 Apoyo a la investigación Científica y Tecnológica en los Programas Educativos de los Institutos Tecnológicos Federales, descentralizados y Centros.

Agradezco al CONACyT por la beca 717535 otorgada en el programa de Maestría en Ciencias en Agrobiotecnología.

Al Instituto Tecnológico de Tlajomulco de Zúñiga por permitirme el uso de las instalaciones para el desarrollo de mi investigación.

A mi directora de tesis, Dra. Mayra I. Montero Cortés por su atención, enseñanzas, paciencia y dedicación a guiarme durante este proceso.

A mis asesores, Dr. Arturo M. Chávez, Dra. Vania S. Farias, Dra. Irma G. López, por brindarme su conocimiento, experiencias y consejos que me sirvieron para la realización de este trabajo.

A mis maestros de asignaturas, por las enseñanzas adquiridas durante la impartición de materias, por medio de las cuales despertaron mi interés en la investigación científica.

A mis padres por su amor, confianza e incondicional apoyo en todas las decisiones que he tomado, a mis hermanos y familia por sus consejos y buenos deseos.

A Daniel, que me ha acompañado durante este proceso, gracias por estar ahí para animarme y siempre motivarme a seguir adelante.

A mis compañeros de generación por brindarme su apoyo y amistad; Juan, Jorge, Isaac y Armando.

Con gratitud a todos mis colegas, amigos de la maestría y servicio social; Denis, Elizabeth, Hugo, Cirilo, Juan S., Iván, Nicolás, José y Carlos.

## RESUMEN

El agrillo (*Rhus allophylloides*), es una especie de interés en la región Altos de Jalisco, conociéndolo por su fruto que es utilizado para elaboración de diversos productos alimenticios. En el presente trabajo se buscó establecer un protocolo de establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* para la propagación de esta especie, utilizando medio semisólido para posteriormente realizar un escalamiento a biorreactores de inmersión temporal (SIT). Para ello se utilizaron microesquejes generados a partir de germinación *in vitro* de semillas. Durante el establecimiento *in vitro* se observaron factores de estrés, por lo que se evaluaron las condiciones de intensidad de luz e intercambio gaseoso (sistemas cerrados/semiabiertos), se estableció que un sistema semiabierto con  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD de intensidad de luz presentó mejores parámetros para el desarrollo de la planta. Para la etapa de multiplicación se utilizó el medio MS completo como medio basal y diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y ácido indolacético (AIB) tanto solas como combinadas, siendo la dosis de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP la presentó mayor brotación con valor promedio de 2.83 brotes. Mientras que AIB y sus combinaciones con BAP resultaron desfavorables para la inducción de brotes, sin embargo, el uso de  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB promovió la formación de raíces. En la etapa de enraizamiento se probó con 50% de medio MS adicionado con auxinas ácido naftalenacético (ANA) e AIB y una mínima concentración de citoquinina BAP logrando formación de raíces, resultando que  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  AIB +  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  ANA favoreció la longitud de la raíz principal con 1.34 cm y promovió la formación de raíces secundarias. Para el establecimiento en biorreactor, Sistema de Inmersión Temporal (SIT) se utilizó medio MS completo adicionado con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, se evaluaron diferentes tiempos de inmersión, resultando con un mejor desarrollo y generación de brotes un tiempo de inmersión de 20 minutos con una frecuencia de 6 horas. En general el uso de un sistema de inmersión temporal demostró una aceleración 2 veces mayor en el desarrollo en comparación con el medio semisólido.

## ABSTRACT

*Rhus allophylloides* has been a kind of interest in the Altos Jalisco region known for its fruit that is used to make various food products. The aim of this study was to determine an establishment protocol, multiplication and rooting *in vitro* for the propagation of this species. A semi-solid medium was used to subsequently scale it to temporary immersion bioreactors (SIT). We used micro-cuttings generated from *in vitro* germination of seeds. During the *in vitro* establishment, stress factors were observed, therefore the conditions of light intensity and gas exchange were evaluated (closed / semi-open systems), it was established that a semi-open system with  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD of light intensity obtained the best parameters for the development of the plant. Complete MS medium was used adding different concentrations alone and combined of BAP and AIB as a basal medium in the multiplication phase, with the dose of  $1 \text{ mg L}^{-1}$  of BAP was the highest with an average value of 2.83 shoots. While for the induction of shoots AIB and its combinations with BAP were unfavorable, however, the use of  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  of AIB promoted the formation of roots. For rooting was tested with 50% MS medium with auxin ANA, AIB and a minimum dose of cytokinin BAP making root formation, but  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  AIB +  $0.2 \text{ mgL}^{-1}$  ANA promoted the formation of secondary roots and increased the length of the main root by 1.34 cm. Finally, a complete MS medium added with  $1 \text{ mg L}^{-1}$  of BAP was used for the establishment in a temporary immersion bioreactor (SIT). Different immersion times were evaluated, an immersion time of 20 minutes with a frequency of 6 hours, increased development, and generation of shoots. In general, the use of a temporary immersion system demonstrated a 2-fold acceleration in development compared to the semi-solid medium.

## ÍNDICE

### Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS .....	iii
ÍNDICE DE CUADROS .....	iv
CLAVE DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	v
1. CAPÍTULO 1. ....	1
1.1 Introducción general .....	1
1.1.1 Revisión de literatura .....	2
1.1.2 Métodos de propagación .....	6
1.1.3 Semillas .....	7
1.1.4 Esquejes.....	13
1.1.5 Cultivo <i>in vitro</i> .....	13
1.1.6 Tipos de cultivo <i>in vitro</i> .....	14
1.1.7 Biorreactores.....	16
1.1.8 Planteamiento del problema.....	18
1.1.9 Justificación.....	19
1.1.10 Hipótesis.....	20
1.1.11 Objetivos.....	21
1.1.12 Bibliografía .....	22
2. CAPÍTULO 2. ....	26
Germinación de semillas de agrillo ( <i>Rhus allophylloides</i> ) en condiciones <i>in vitro</i> .....	26
2.1 .....	26
2.1.1 Resumen .....	26
2.1.2 Introducción.....	26
2.1.3 Metodología .....	28
2.1.4 Resultados .....	30
2.1.5 Conclusiones .....	33
2.1.6 Bibliografía .....	34
3. CAPÍTULO 3. ....	35
3.1 Establecimiento de protocolo de propagación de agrillo ( <i>Rhus allophylloides</i> ) en condiciones <i>in vitro</i> .....	35
3.1.1 Resumen .....	35

3.1.2	Introducción.....	35
3.1.3	Metodología .....	39
3.1.4	Diseño de experimento y análisis de datos .....	42
3.1.5	3.3 Resultados y discusión.....	43
3.1.6	Conclusiones .....	58
3.1.7	Bibliografía .....	59
4.	CAPÍTULO 4. ....	61
4.1	Propagación de plantas de agrillo ( <i>Rhus allophylloides</i> ) por medio de biorreactores .....	61
4.1.1	Resumen .....	61
4.1.2	Introducción.....	61
4.1.3	Metodología .....	64
4.1.4	Diseño experimental y análisis de datos .....	65
4.1.5	Resultados .....	66
4.1.6	Conclusiones .....	72
4.1.7	Bibliografía .....	72
5.	CAPÍTULO 5. ....	75
5.1	Discusión general y conclusiones .....	75
5.1.1	Bibliografía .....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 <i>RHUS ALLOPHYLLOIDES</i> STANDL.....	3
FIGURA 1.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE <i>RHUS ALLOPHYLLOIDES</i> STANDL, <i>R SCHMIDELOIDES</i> , SCHLECHT Y <i>R. SCHMIDELOIDES</i> VAR. POTOSINENSIS BARKL. ...	4
FIGURA 2.1. GERMINACIÓN DE SEMILLA <i>IN VITRO</i> .....	31
FIGURA 2.2 GERMINACIÓN ACUMULADA DE SEMILLAS DE AGRILLO. INFLUENCIA DEL EFECTO DE BAP A AIB EN LA GERMINACIÓN DURANTE 15 DÍAS.....	33
FIGURA 3.1 DESARROLLO DE PLANTAS DE AGRILLO EN LOS DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	46
FIGURA 3.2 PESO FRESCO Y PESO SECO A LOS 30 Y 60 DÍAS DE DESARROLLO DE LAS PLÁNTULAS <i>IN VITRO</i> .....	47
FIGURA 3.3 EFECTO DE BAP EN EL DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE AGRILLO, TRATAMIENTOS (TM1 AL TM3) .....	51
FIGURA 3.4 EFECTO DE BAP EN EL DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE AGRILLO, TRATAMIENTOS (TM4 AL TM6) .....	52
FIGURA 3.5 EFECTO DE BAP EN EL DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE AGRILLO, TRATAMIENTOS (TM7 AL TM8) .....	53
FIGURA 3.6 EFECTO DE BAP EN EL DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE AGRILLO, TRATAMIENTOS (TM9 AL TM10). .....	54
FIGURA 3.7 DESARROLLO DE CALLO EN EL TRATAMIENTO TM5 AL DÍA 45 DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	55
FIGURA 3.8 ENRAIZAMIENTO DE PLANTAS DE AGRILLO EN CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	57
FIGURA 4.1 ESTABLECIMIENTO DE LOS TRATAMIENTOS EN EL DÍA CERO DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	66
FIGURA 4.2 DESARROLLO DE PLANTAS DE AGRILLO A LOS 30 DÍAS DE CULTIVO EN SIT .....	68
FIGURA 4.3 ESTABLECIMIENTO <i>EX VITRO</i> DE VITROPLANTAS DE AGRILLO AL DÍA CERO	70
FIGURA 4.4 ACLIMATACIÓN DE VITROPLANTAS DE AGRILLO EN CONDICIONES <i>EX VITRO</i> .....	71
FIGURA 5.1 ESQUEMA INTEGRADOR DE PROTOCOLOS DE PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> DE PLANTAS DE AGRILLO.....	80



## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1.1 SUBGÉNERO, SECCIONES Y SUBSECCIONES DE <i>RHUS</i> .....	3
CUADRO 2.1 GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y ETAPAS DE FORMACIÓN DE PLÁNTULAS DE <i>RHUS ALLOPHYLLOIDES</i> .....	30
CUADRO 2.2 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN EN ÍNDICE DE VELOCIDAD DE GERMINACIÓN (IVG) HASTA EL DÍA 15.....	32
CUADRO 3.1 EFECTO DE INTENSIDAD DE LUZ Y AIREACIÓN EN EL DESARROLLO DE PLANTAS DE AGRILLO A LOS 30 Y 60 DÍAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	45
CUADRO 3.2 EFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO EN EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS DE AGRILLO A LOS 30 Y 60 DÍAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	49
CUADRO 3.3 EFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO EN EL ENRAIZAMIENTO DE PLANTAS DE AGRILLO A LOS 30 DÍAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	56
CUADRO 4.1. EVALUACIÓN DE LOS TIEMPOS DE INMERSIÓN PARA EL DESARROLLO DE PLANTAS DE AGRILLO A LOS 30 DÍAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	67
CUADRO 4.2 PORCENTAJE DE ACLIMATACIÓN EX VITRO DE PLANTAS DE AGRILLO EN SUSTRATO A LOS 15 DÍAS .....	69

## CLAVE DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABREVIATURA	TÉRMINO
°C	Grados Celsius
Km, m, cm, mm	Kilómetro, metro, centímetro, milímetro
pH	Potencial hidrogeno
$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Unidad radiación fotosintética activa
$\text{mgL}^{-1}$ , $\text{gL}^{-1}$ .	Miligramo por litro, gramo por litro
s, min, hrs.	Segundo, minuto, horas
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog
Gelrite®	Agente gelificante
BAP	6-Bencilaminopurina
AIB	Ácido indol butírico
ANA	Ácido 1-naftalenacético
IAA	Ácido indolacético
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
TDZ	Thidiazuron
$\text{GA}_3$	Ácido giberélico
ABA	Ácido abscísico
SIT	Sistema de inmersión temporal
RITA®	Recipiente de inmersión temporal automatizado
BIOMINT®	Agitador orbital
SETIS™	Recipiente de inmersión temporal
Benomilo	Fungicida sistémico agrícola
PPM™	Mezcla de conservación de plantas
RADIX® 10,000	Regulador de crecimiento vegetal
PVP	Polivinilpirrolidona
ANOVA	Análisis de varianza
±	Mas menos
SD	Desviación Estándar
p/v	Peso por volumen de solución
CONABIO	Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
sp. spp.	Especie - especies

## 1. CAPÍTULO 1.

### 1.1 Introducción general

México es uno de los 12 países con mayor diversidad de ecosistemas donde ocupa el quinto lugar con casi el 70% de la variedad de plantas y animales del mundo (SEMARNAT, 2018). Destaca por su riqueza de especies, muchas de las cuales son endémicas y no se encuentran de forma natural en otras regiones del planeta. El endemismo en nuestro país está presente en distintos niveles taxonómicos, desde el nivel de familia, hasta de géneros, especies y subespecies (Meiners, 2007). Nuestro país ocupa el tercer lugar en plantas endémicas, se destaca también como uno de los países que ha sido el centro de origen de algunas de las plantas cultivadas más importantes para la humanidad. Se calcula que poco más de 15% de las especies vegetales que se consumen en el mundo tienen su origen en México (CONABIO, 2006).

En regiones de Jalisco y Michoacán, se encuentra una especie endémica: *Rhus allophylloides*, que produce un fruto denominado “agrillo” el cual tiene una alta demanda por los habitantes de la región para su consumo alimenticio

Se desconocen métodos convencionales para su reproducción, al ser una especie leñosa se podría realizar mediante estacas, pero se presentan diversas desventajas debido a que la propagación es lenta y se generan pocas plantas a partir de una sola, la reproducción por semilla sería más viable por la disponibilidad de material, aunque estudios reportan que presenta un bajo porcentaje de germinación (Quintana-Camargo, 2016).

El cultivo *in vitro* puede optimizar la obtención de plantas de agrillo, en grandes cantidades en un tiempo menor. La micropropagación también permite obtener nuevas plántulas todo el año, independientemente del factor climático, además se pueden manejar cultivos libres de enfermedades y patógenos. Existen informes sobre propagación *in vitro* del género *Rhus* en donde se logra la regeneración de brotes a partir de yemas axilares o secciones de tallo en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962). Cabe destacar, que las especies

reproducidas no son endémicas de México y no existen protocolos para la micropropagación de *Rhus allophylloides* considerada una especie de interés debido a la demanda de fruto en la región.

### 1.1.1 Revisión de literatura

#### 1.1.1.1 Descripción del género *Rhus*

Pertenece a la familia Anacardiaceae, de árboles y arbustos normalmente de hojas alternas y con frecuencia pinnado-compuestas, aunque también se dan las hojas simples. (Huamani y Ruiz, 2005). El género *Rhus* incluye alrededor de 35 especies, y sus especies se clasifican en dos subgéneros: *Rhus* y *Lobadium* (Young, 1975, 1978; Miller *et al.*, 2001).

Se ha propuesto que el género se originó en América del Norte o en América del Norte y Asia; el registro fósil más antiguo se localizó en América del Norte (Hong, 1999). Yi *et al.* (2004) sugieren que los dos subgéneros evolucionaron en América del Norte, y que el subgénero *Rhus* se dispersó a Eurasia.

Dentro del subgénero *Rhus* se reconocen 10 especies, cuatro de ellas se distribuyen en el este de Eurasia, cuatro en América del Norte, una en el sureste europeo y otra en las islas Hawaii (Barkley, 1973; Young, 1975).

El subgénero *Lobadium* consta de aproximadamente 25 especies agrupadas en tres secciones, *Lobadium*, *Styphonia* y *Terebinthifolia*, la sección de *Styphonia* a su vez se divide en subsecciones nombradas *Styphonia*, *Composita* e *Intermedia*, distribuidas principalmente en el suroeste de los Estados Unidos, México y en el Norte de América Central (Young, 1978). El género *Rhus allophylloides* pertenece al subgénero *Lobadium* a la sección *Lobadium* como se muestra en el Cuadro 1. (Barkley, 1973; Young, 1978).

Cuadro 1.1 Subgénero, secciones y subsecciones de *Rhus*

<i>Rhus</i>	<i>Lobadium</i>				
	<i>Lobadium</i>	<i>Terebinthifolia</i>	<i>Styphonia</i>		
<i>R. copallina</i>	<b><i>R. allophyloides</i></b>	<i>R. barclayi</i>	<i>Styphonia</i>	<i>Composita</i>	<i>Intermedia</i>
<i>R. coriaria</i>	<i>R. aromática</i>	<i>R. costaricensis</i>	<i>R. integrifolia</i>	<i>R. andrieuxii</i>	<i>R. chondroloma</i>
<i>R. glabra</i>	<i>R. microphylla</i>	<i>R. hartmani</i>	<i>R. keameyi</i>	<i>R. choriophylla</i>	
<i>R. lanceolata</i>	<i>R. schmidelioides</i>	<i>R. jaliscana</i>	<i>R. muelleri</i>	<i>R. lentii</i>	
<i>R. michauxii</i>	<i>R. trilobata</i>	<i>R. palmeri</i>	<i>R. ovata</i>	<i>R. nelsonii</i>	
<i>R. sandwicensis</i>		<i>R. rubifolia</i>	<i>R. standleyi</i>	<i>R. oaxacana</i>	
<i>R. typhina</i>		<i>R. terebinthifolia</i>		<i>R. pachyrrhachis</i>	
				<i>R. schiedeana</i>	
				<i>R. virens</i>	

### 1.1.1.2 Clasificación taxonómica del Agrillo

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Anacardiaceae

Género: *Rhus*

Especie: *Rhus allophyloides*



Figura 1.1 *Rhus allophyloides* Standl.

### 1.1.1.3 Descripción botánica

*Rhus allophylloides* descrito por Barkley (1937) es un arbusto que puede llegar a medir unos 3 m. largo, presenta hojas con 3 folíolos agudos cuneados en la base y serrados-dentados cerca del ápice, folíolos terminales de 7-10 cm. largo y 3.5-5.5 cm. ancho, con peciolo de aproximadamente 1 cm. Folíolos laterales largos de 4.5-7 cm. largo, 2-3.5 cm. ancho, sésil. Presenta una inflorescencia terminal de 5 cm. largo, 3.5 cm. ancho, brácteas deltoides, aproximadamente de 2 mm. largo y ancho, agudo, pubescente en ambas superficies y ciliado con pelos simples, persistente; sépalos deltoides-ovados, 1.5 mm. largo, ancho un poco más estrecho, glabro, ciliado con pelos simples; pétalos blancos en estado seco, elípticos, de unos 3 mm. largo, 2 mm. ancho, ciliado con pelos simples; filamentos casi tan largos como los sépalos; anteras ovales, 1 mm. largo y ancho. El fruto es rojo, pubescente con pelos simples y glandulares. En México su distribución es entre el estado de Jalisco a Michoacán, ver figura 1.2

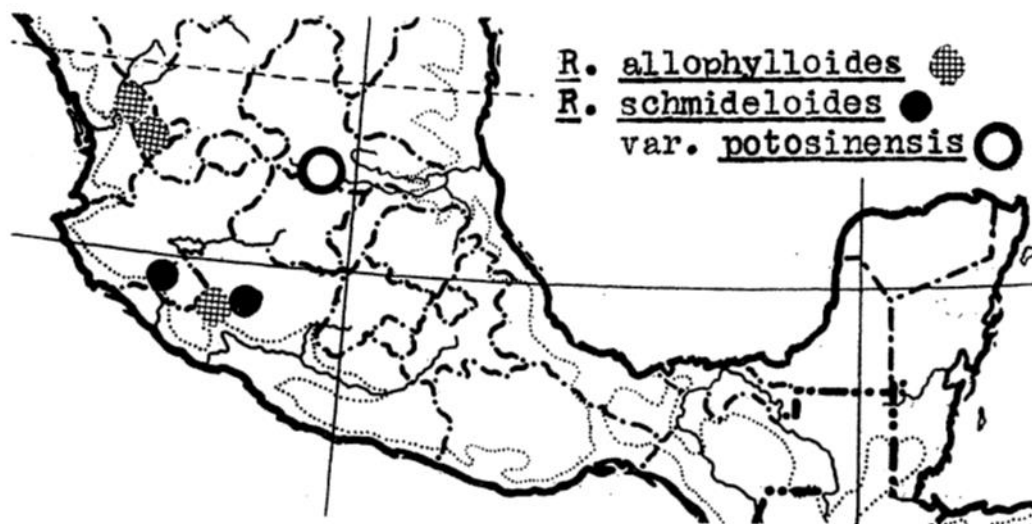


Figura 1.2 Distribución geográfica de *Rhus allophylloides* Standl, *R schmideloides*, Schlecht y *R. schmideloides* var. *potosinensis* Barkl.

#### 1.1.1.4 Importancia ecológica

El género *Rhus* actúa como plantas polinizadoras para la fauna de invierno, al ser plantas extensas que proporcionan néctar y polen en la primavera y también mantienen sus bayas durante la mayor parte del invierno. La mayoría de las regiones de América del Norte tienen una especie adaptada localmente. (*Rhus typhina*) se encuentra en el noreste, mientras que (*Rhus glabra*) y (*Rhus aromatica*) se encuentran en todo Estados Unidos. (Xerces Society, 2015).

#### 1.1.1.5 Importancia económica

Las especies del género *Rhus* tienen una larga historia en usos por los indígenas como medicamento, como alimento y otros beneficios (Van and Wink, 2004).

Por ejemplo: *R. glabra* es utilizado tradicionalmente por pueblos nativos de América del Norte en el tratamiento de bacterias y enfermedades como sífilis, gonorrea y gangrena (Erichsen-Brown, 1989).

*R. coriaria* crece de forma silvestre en la región de las Islas Canarias a través de la región mediterránea hasta Irán y Afganistán. Su uso común es como condimento, el cual se obtiene moliendo los frutos secos con sal, se utiliza en diferentes alimentos como kebabs, carne y ensaladas. Tiene un sabor amargo (pH 2,5) derivado de los ácidos cítricos y málicos que se encuentran en el jugo. También es utilizado como hierba medicinal para el tratamiento de la indigestión, anorexia, diarrea, hemorragia y la hiperglucemia (Wetherilt and Pala, 1994).

Investigaciones realizadas con extractos de *Rhus* muestran aplicaciones como: antifibrogénico, antifúngico, antiinflamatorio, antimaláricos, antibióticos, antimutagénicos, antioxidante, antitrombina, antitumoral, antiviral, citotóxico, hipoglucemiante y leucopenia. (Sierra, 2007).

Luna (2015) demostró que existe actividad antifúngica *in vitro* de los extractos acuosos de *R. virens* y *R. muelleri* contra *Fusarium oxysporum*.

#### **1.1.1.6 Producción de fruto**

Dentro del territorio mexicano *R. allophylloides* existe como una especie silvestre, es nombrado comúnmente de diversas maneras dependiendo la región: “Agrillo”, “Agrito”, “Limilla”. Este fruto es de temporada y se recolecta en cerros, particularmente en la región Altos de Jalisco se encuentra disponible en los meses de febrero a abril. El precio de comercialización actual es del orden de los doscientos cincuenta pesos mexicanos por kilogramo.

El fruto del agrillo es apreciado y demandado por los habitantes de la región, ya que con él se elaboran diversos productos alimenticios: agua fresca, helado, paletas de hielo y dulces (Quintana-Camargo, 2016).

#### **1.1.2 Métodos de propagación**

La propagación de planta consiste en la capacidad de los seres vivos de producir seres semejantes a los existentes involucra la aplicación de principios y conceptos biológicos enfocados a la multiplicación de plantas útiles de un genotipo específico. Esta multiplicación se realiza a través de explantes, los cuales se definen como cualquier parte de la planta que se utilice para producir una nueva planta o una población. Los explantes incluyen semillas, segmentos de tejido, yemas, esquejes o estacas, y diversas estructuras especializadas como bulbos, o tubérculos. El principio de la propagación de plantas se basa en los conceptos de pluripotencia y totipotencia, características de las células para generar órganos o un organismo entero respectivamente, debido a que la célula posee toda la información genética necesaria para su regeneración (Hartmann *et al.*, 1997).

##### **1.1.2.1 Propagación vegetativa o asexual**

Se utiliza para producir una planta que posea el mismo genotipo que la planta madre (planta donadora) y esto es posible porque todas las células de una planta poseen la información necesaria y/o suficiente para reproducir la planta entera (Hartmann *et al.*, 1997).



### **1.1.2.2 Propagación Sexual**

La generación de un nuevo individuo conlleva al intercambio de material genético. Existe unión de células reproductoras llamadas gametos y un desarrollo embrionario que dará lugar al nuevo organismo.

### **1.1.2.3 Polinización**

La polinización es una etapa esencial en la reproducción de plantas con flores. Es la transferencia de polen del macho a la parte femenina de una flor (McGregor, 1976).

En el caso de *Rhus* la información sobre la polinización son muy limitados en la literatura. Estudios realizados por Rowe y Blazich (2002) informan que las flores suaves de *Rhus* son polinizadas por abejas, sin embargo, no se han enfocado estudios para determinar los insectos que juegan el papel de polinizadores de este género en el área.

### **1.1.3 Semillas**

La semilla es el órgano de propagación a través del cual el nuevo individuo se dispersa. El éxito con el cual este nuevo individuo se establece (tiempo, lugar y vigor de la plántula), está en gran medida determinado por las características fisiológicas y bioquímicas de la semilla. Sin embargo, hay factores externos que no siempre son favorables para que esto ocurra como el suelo, clima, competencia y depredación entre otros. Las respuestas de las semillas al ambiente y las sustancias de reserva que contiene (carbohidratos, lípidos, proteínas), son de gran importancia para el éxito del establecimiento de la plántula hasta que ésta sea capaz de utilizar la luz y hacerse autótrofa (Bewley y Black, 1994; Orozco y Sánchez, 2013).

Las semillas vivíparas tienen la característica que la semilla germina mientras todavía está unida a la planta madre. Además, la plántula crece, emerge de la fruta y finalmente se dispersa (Elmqvist y Cox, 1996).

Las semillas recalcitrantes son aquéllas que pasan por un corto o ningún secado de maduración, y permanecen sensibles a la deshidratación, tanto en su desarrollo como después de su desprendimiento. Sin embargo, esta situación es mucho más compleja debido a la amplia gama de variabilidad entre las semillas recalcitrantes de diferentes especies y, ciertamente, de especies individuales bajo diferentes condiciones (Berjak y Pammenter, 1997). Las semillas recalcitrantes no experimentan deshidratación en la planta madre y, sin detener su desarrollo, pasan directamente a la germinación (Farrant *et al.*, 1993), aun cuando ocurren algunos casos de latencia (Berjak y Pammenter, 2004). Estas se diseminan en una condición húmeda y metabólicamente activa (Leprince *et al.*, 1993; Kainer *et al.*, 1999), perdiendo rápidamente su capacidad de germinación al quedar expuestas a condiciones de baja humedad (Kermode y Finch-Savage, 2002).

Las semillas ortodoxas (Roberts, 1973) adquieren tolerancia a la deshidratación durante su desarrollo y pueden almacenarse en estado seco, por períodos predecibles y bajo condiciones específicas. Su fase final de maduración está acompañada por deshidratación celular, la cual inicia con la pérdida de agua del suministro vascular de la planta madre a la semilla, como resultado de la separación de funículos entre 40 y 50 días después de la polinización (Bewley y Black, 1994). En este período las semillas adquieren la tolerancia para ceder a la deshidratación, característica que mejora su viabilidad y el potencial de almacenamiento (Nkang, 2002; Hoekstra *et al.*, 1994).

La semilla como unidad básica de reproducción para la gran mayoría de especies vegetales, debe reunir ciertas características que garanticen su conveniencia para su utilización en programas de reforestación y conservación de germoplasma. Para el caso del agrillo se desconocen los parámetros de evaluación de calidad (Quintana-Camargo, 2016).

### 1.1.3.1 Germinación

El proceso de germinación comienza con la imbibición / absorción de agua por la semilla seca y termina con la penetración de radícula a través de las capas de cobertura de la semilla (Bewley, 1997; Weitbrecht *et al.*, 2011). En general, la absorción de agua por semillas secas exhibe **tres fases** (Bewley, 1997):

**Fase I** se caracteriza por la rápida absorción inicial de agua por una semilla seca que causa hinchazón y cambio de forma (Bewley, 1997). La estructura de la membrana se ve perturbada por la rápida rehidratación, lo que lleva a la fuga de metabolitos de bajo peso molecular y solutos celulares fuera de la semilla; sin embargo, la estructura de la membrana se repara después de un corto período de hidratación. Durante esta fase de absorción de agua, se inician una serie de procesos fisiológicos, que incluyen la síntesis de proteínas a partir del ARNm existente y la reanudación de actividades respiratorias como las vías respiratorias de fosfato de pentosa glicolítico y oxidativo. La reanudación de las actividades respiratorias se caracteriza por un gran aumento del consumo de oxígeno y la liberación de dióxido de carbono a los pocos minutos de la imbibición (Bewley, 1997). La fase I de la absorción de agua también está asociada con la reparación del ADN, que se daña durante la fase de desecación del desarrollo de la semilla, y esta reparación del ADN involucra la ADN ligasa que se activa después de la imbibición (Bewley, 1997; Weitbrecht *et al.*, 2011).

La reparación de las mitocondrias existentes también se inicia durante la fase I de la imbibición de la semilla. Dado que las semillas secas contienen una baja cantidad de trifosfato de adenosina (ATP), la reparación de las mitocondrias durante la absorción desempeña un papel en la producción de ATP requerida para el proceso de germinación. Una vez que la tasa de absorción de agua de las semillas disminuye y se estabiliza, las semillas germinantes entran en la fase II (Bewley, 1997; Weitbrecht *et al.*, 2011).

**Fase II** varios eventos tienen lugar, incluida la reparación continua del ADN y las mitocondrias existentes, la síntesis de nuevas mitocondrias y la síntesis de proteínas a partir de transcripciones génicas recién sintetizadas.

Además, el inicio de la expansión del embrión y el debilitamiento de las capas de cobertura de semillas ocurren durante esta fase (Bewley, 1997). La protuberancia de los radios a través de la capa de testa / semilla, que se define como germinación, marca el final de la fase II y el comienzo de la fase III (etapa de postgerminación).

**Fase III** se caracteriza principalmente por la movilización de reservas de almacenamiento depositadas en órganos de almacenamiento, como el endospermo en los cereales; Esto desencadena mayores aumentos en la absorción de agua, seguido por el crecimiento de las plántulas (Nonogaki *et al.*, 2010). La división celular, la síntesis de ADN y el alargamiento de las células radicales también se producen durante la tercera fase de la absorción de agua.

La germinación *in vitro* tiene ventajas respecto a la producida en condiciones naturales, ya que puede solucionar casos de inhibición total de la germinación, aumentar la tasa de germinación, reducir el tiempo y homogeneizar la germinación (López-Encina y González-Padilla, 1996).

#### **1.1.3.2 Dormancia**

La latencia de las semillas se define como la incapacidad de las semillas viables intactas para completar la germinación en condiciones ambientales favorables (Gao y Ayele, 2014).

La latencia de semillas puede clasificarse como latencia primaria y latencia secundaria, en función de cuándo se produce la inducción de la latencia:

La latencia primaria es establecida durante el desarrollo de la semilla debido a factores endógenos y / o condiciones ambientales experimentadas por la planta madre (Gao y Ayele, 2014).

Las semillas que exhiben latencia primaria pueden liberarse del estado de latencia mediante una serie de tratamientos, que incluyen la maduración posterior, definida como un período de almacenamiento en seco de semillas recién cosechadas a temperatura ambiente; y estratificación en frío, que se refiere a la hidratación / absorción de semillas a bajas temperaturas.

Cuando se enfrentan a condiciones que son desfavorables para la germinación, las semillas no latentes también pueden entrar en el estado de latencia, y este tipo de latencia se conoce como latencia secundaria (Kermode, 2005).

La latencia primaria se clasifica además en cinco tipos diferentes: latencia fisiológica, latencia morfológica, latencia morfofisiológica, latencia física y latencia combinacional (latencia fisiológica y física) (Baskin y Baskin, 2004).

Según las causas de la latencia, la latencia fisiológica se clasifica como latencia inducida por embriones y latencia inducida por la cubierta de la semilla (Hilhorst *et al.*, 2010).

La latencia inducida por el embrión puede ser causada por una serie de factores relacionados con el embrión, incluida la inmadurez o el subdesarrollo del embrión y / o la síntesis de compuestos inhibidores de la germinación dentro del embrión. Como resultado, un embrión extirpado no puede crecer.

La latencia inducida por el recubrimiento de semillas es causada por los tejidos que rodean al embrión, como el endospermo y / o la testa, que confieren restricciones contra el crecimiento del embrión, al interferir con la lixiviación de los inhibidores de la germinación del embrión y al restringir el intercambio gaseoso y la absorción de agua por la semilla.

### **1.1.3.3 Factores internos que regulan la germinación**

Los principales factores internos que determinan el que una semilla germine son la viabilidad y la longevidad (el tiempo que la semilla puede permanecer viable).

La semilla debe estar viva para poder germinar; el daño mecánico y las condiciones de almacenamiento pueden disminuir la viabilidad de las semillas. Muchos factores determinan la viabilidad de las semillas enterradas en el suelo, aún bajo condiciones experimentales controladas. El contenido de humedad y pH del suelo, así como la latencia e impermeabilidad de las cubiertas de la

semilla que puede variar entre poblaciones de semillas de la misma especie, son factores importantes que afectan la viabilidad (Bewley y Black, 1994).

Semillas de plantas características de climas áridos tienen en general semillas con mayor longevidad respecto a semillas de plantas de hábitats tropicales o templados húmedos (Desai, 1997).

#### **1.1.3.4 Regulación hormonal de la latencia y la germinación**

Las hormonas vegetales están involucradas en la regulación de la inducción, mantenimiento y liberación de la latencia de las semillas (Bentsink y Koornneef, 2008; Gao y Ayele, 2014); Mecanismos moleculares de la germinación de semillas ABA y GA juegan un papel importante a este respecto. ABA regula la inducción y el mantenimiento de la latencia (Kermode, 2005). Las giberelinas son necesarias para la producción de la enzima mananasa, la cual es necesaria para la germinación de la semilla (Wang *et al.*, 2005).

Además del ABA y GA, otras hormonas vegetales como el etileno, la citoquinina, el brasinoesteroide, la auxina y los jasmonatos (JA) se han implicado en la regulación de la latencia y germinación de las semillas.

En especies deficientes de giberelinas, el etileno puede actuar de manera similar a las giberelinas y las semillas son capaces de germinar completamente en tal situación (Karssen *et al.*, 1989; Matilla y Matilla-Vázquez, 2008).

La citoquinina también contribuye a la liberación de latencia de las semillas a través de la mejora de la biosíntesis de etileno (Babiker *et al.*, 1993; Kucera *et al.*, 2005), y promueve la germinación de las semillas al antagonizar los efectos inhibidores de la germinación de ABA (Guan *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2011). El brasinoesteroide es la otra hormona vegetal que puede promover la germinación de las semillas al antagonizar los efectos del ABA.

#### 1.1.4 Esquejes

En la multiplicación por estacas solo es necesario que un nuevo sistema de raíces adventicias se desarrolle, ya que la estaca posee yemas con aptitud potencial para desarrollar nuevos vástagos (Hartmann *et al.*, 1997).

Estaca o esqueje son las unidades de multiplicación que se obtienen separando de la planta madre un segmento que contenga zonas meristemáticas (nudos y entrenudos), para la propagación de la planta. Pueden obtenerse de tallos, de hojas o raíces, que colocadas en condiciones favorables son capaces de formar un nuevo individuo con los mismos caracteres de la planta madre (clones).

#### 1.1.5 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* se basa en el aislamiento de órganos, tejidos o células vegetales en el que se ajusta y controlan las condiciones requeridas para la obtención de respuestas fisiológicas o morfogénicas a partir de estos explantes (Höxtermann, 1997). Para ello se pueden evaluar varias formulaciones minerales disponibles para cultivar tejidos de plantas, por lo que a través del tiempo diversos investigadores han formulado medios de cultivos en los que se tiene una respuesta favorable para la propagación *in vitro* de plantas, algunos ejemplos de ellos son el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y el medio B5 de Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968).

En general, los medios de cultivo de tejidos vegetales están compuestos de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, reguladores de crecimiento, también pueden contener otros adyuvantes (como el agua de coco) y deben contener una fuente de carbono (sacarosa).

El regulador del crecimiento de las plantas es una sustancia orgánica requerida por la planta en pequeñas cantidades para regular el crecimiento de una planta (Chen *et al.*, 2008), también se conoce como hormona vegetal, la cual se puede ser de origen natural o sintético (George, 2000). El regulador de crecimiento desempeña diferentes papeles en la promoción de la diferenciación

celular, el crecimiento y la división celular. Existen diferentes tipos de hormonas vegetales entre las cinco principales se reconocen la auxina, la citoquinina, las giberelinas, el ácido abscísico y el etileno. Las auxinas y las citoquininas son los reguladores de crecimiento vegetal más utilizados en el cultivo de tejidos vegetales para la regeneración de plantas a través de diferentes métodos de propagación *in vitro*, que se describen en la siguiente sección.

### **1.1.6 Tipos de cultivo *in vitro***

La producción de plantas puede realizarse mediante cultivos de tejidos vegetales diferenciados o indiferenciados. Los cultivos vegetales indiferenciados se obtienen a partir de órganos o tejidos organizados cultivados en un medio nutritivo (sólido o líquido) que desdiferencian ante la presencia de auxinas exógenas. En el caso de cultivos diferenciados incluye la embriogénesis somática y la organogénesis.

#### **1.1.6.1 Embriogénesis**

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979) se puede obtener directamente a partir de células aisladas o utilizando callos, teóricamente este método es el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* debido a la naturaleza bipolar del embrión, la posibilidad de ser automatizado todo el proceso productivo, los altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo, al poder aplicarse los principios de la cinética microbiana con la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales.

Sus desventajas radican en el desconocimiento que existe sobre los parámetros que regulan este proceso, siendo aún limitado el número de especies en los cuales se describe una embriogénesis somática eficiente que permita un uso como método de multiplicación de plantas (Yeung *et al.*, 1996).



### 1.1.6.2 Organogénesis

Es uno de los principales métodos de regeneración de plantas, puede clasificarse en indirecta y directa. La primera tiene lugar cuando la formación de brotes ocurre mediante una fase intermedia de formación de callos, mientras que la organogénesis directa, consiste en la generación de órganos (brotes, raíces, hojas, etc.) a partir del explantes, sin fases intermedias de callo (George y Debergh, 2008).

Este proceso morfogénético se induce artificialmente por medio de reguladores del crecimiento (RC). Generalmente se emplean auxinas como: ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y citoquininas como bencilaminopurina (6-BAP), zeatina, kinetina y tidiazurón (TDZ) (Machakova *et al.*, 2008).

El establecimiento de cultivos *in vitro* mediante la siembra de semillas ofrece grandes ventajas para la propagación: proporciona de una manera rápida plántulas que sirven como fuente de explantes para llevar a cabo la micropropagación; es una manera de conservar plántulas con variabilidad genética natural, y es un método que permite la germinación de semillas que de forma natural no lo hacen o es muy difícil de hacer en condiciones normales (Fay, 1992; Pierik, 1993).

La micropropagación se puede realizar en medio semisólido y medio líquido, en el segundo caso el uso de medios líquidos se considera la solución ideal para reducir los costos de producción de plántulas y permitir la automatización (Preil, 2005).

### 1.1.7 Biorreactores

Un biorreactor es un sistema de cultivo usualmente automatizado cuya principal función es proveer al cultivo *in vitro* de un ambiente controlado para lograr las condiciones óptimas para el crecimiento celular y para la producción de subproductos de interés comercial provenientes del cultivo.

Para la propagación de plantas un biorreactor es diseñado para el cultivo de diferentes tejidos vegetales como segmentos de hojas, tallos, brotes y hasta callos (grupos de células sin diferenciación celular), de los que previamente se han establecido las condiciones y medios de cultivo para la formación de plántulas.

Consta de un recipiente, que puede ser de vidrio o de plástico claro (policarbonato transparente que pueda ser esterilizado), que de forma automática provee el medio de cultivo en tiempo y cantidades óptimas bajo ambientes controlados de luz y temperatura.

Dependiendo del tipo, forma del contenedor y sistema de agitación, se han diseñado biorreactores con agitación rotatoria (Tanque agitado o de Tambor rotatorio), por burbujeo (Air-Lift), de difusión o perfusión y de inmersión temporal (SIT). Éste último es el más utilizado ya que se caracteriza por sumergir parcialmente los tejidos vegetales durante periodos iterativos por un sistema automatizado.

#### 1.1.7.1 Biorreactores de Inmersión Temporal

Los biorreactores de inmersión temporal se distinguen por utilizar un método que consiste en humedecer de manera intermitente y por un corto periodo de tiempo el tejido de una planta con medio de cultivo líquido, seguido por el secado por gravedad o automatizado.

Estos sistemas de propagación de plantas utilizan el mecanismo de adición y remoción del medio de cultivo líquido en tiempos programados e

intermitentes, lo que evita problemas de asfixia e hiperhidricidad (tejidos con alto contenido de agua), los daños mecánicos, con lo que se logra un aumento en la eficiencia de la micropropagación, dado por el incremento de los ritmos de producción y la calidad de las plantas propagadas. Con este sistema se provee a todos los tejidos bajo cultivo de un óptimo contacto con el medio de cultivo durante un período de tiempo muy corto y con una determinada frecuencia diaria, lo que acelera los procesos de formación, desarrollo y proliferación de plántulas.

El tiempo y frecuencia de inmersión tienen gran importancia, tanto para la asimilación de los nutrientes por los tejidos vegetales, como en la renovación de la atmósfera interna del recipiente de cultivo. Pero también, son determinantes para el éxito de la propagación con este sistema, el tamaño del biorreactor, el volumen del medio de cultivo y la densidad de los tejidos cultivados (Muñiz, 2018).

#### **1.1.7.2 Factores que afectan los sistemas de inmersión temporal (SIT)**

La estrategia para establecer un cultivo en SIT consiste en utilizar explantes provenientes de cultivo *in vitro* a fin de eliminar el problema de la contaminación microbiana y las consiguientes pérdidas de cultivo.

Sin embargo, particularmente en especies leñosas, los explantes (nudos, brotes) portan bacterias u hongos endógenos que proliferan muy rápidamente una vez expuestos al medio líquido. Esto, junto con un número relativamente grande de explantes colocados en cada recipiente, es la causa principal de las pérdidas como en el cultivo de eucalipto SIT (Watt *et al.*, 2006). Por lo tanto, en grandes actividades comerciales, las implicaciones de costos de tales incidentes pueden ser extremadamente graves.

La táctica más comúnmente empleada es tratar los explantes con o incorporar antibióticos y biocidas como PPM<sup>™</sup> (Plant Cell Technology, Washington, DC) en el medio. Aunque a menudo tienen éxito, los antibióticos son caros, tienen condiciones de pH óptimas y se degradan rápidamente (McAlister *et al.*, 2005; Luna *et al.*, 2008).

### **1.1.8 Planteamiento del problema**

El fruto del agrillo presenta una alta demanda para elaborar productos alimenticios de consumo por los habitantes de Arandas, Jalisco. Debido a que en la actualidad no se tiene establecido un cultivo de plantas de agrillo, se dificulta garantizar su disponibilidad durante todo el año ya que es un fruto de temporada y el principal problema es que al ser una especie silvestre se desconoce la ubicación exacta de las plantas, las cuales se encuentran principalmente en cerros de la región, además que la recolección del fruto es difícil por la baja producción que se tiene por planta, por lo que es necesario recorrer largas distancias para poder cosechar las cantidades requeridas de este fruto para el mercado local.

El establecimiento de la especie en diversas zonas se ha visto afectada por el bajo porcentaje de germinación de la semilla, aunado a la escases de semilla para la propagación de la especie debido a la recolección del fruto, por otro lado el uso de suelo para la explotación agrícola repercute en la dificultad de encontrar plantas de agrillo, ya que el establecimiento de un cultivo comercial implica aplicaciones de herbicidas o eliminación de cualquier planta ajena al cultivo que se pretende establecer, provocando una disminución en la población silvestre de plantas del agrillo, y como consecuencia una baja disponibilidad de fruto e incremento del costo.

Es necesario conocer y establecer diversas estrategias de propagación de la especie. Con las cuales se puedan generar plantas productivas que puedan satisfacer la demanda de fruto y mantener los costos de venta.

### 1.1.9 Justificación

El uso de técnicas como el cultivo *in vitro*, donde se generan plantas a partir de células o tejidos se considera una herramienta fundamental de la biotecnología vegetal. Disponer de estas técnicas nos permite la regeneración de plantas para la propagación, saneamiento y conservación de material vegetal (Celestino *et al.*, 2005).

Por lo anterior se propone la generación y establecimiento de un protocolo para la propagación de plantas de agrillo *in vitro* en medio semisólido y en un sistema de inmersión temporal (SIT) que nos permita obtener plantas sanas, acortar los periodos de propagación y tener una alternativa a los métodos convencionales de propagación, con la finalidad de generar plantas de agrillo para personas interesadas en establecer un cultivo de la especie.

### 1.1.10 Hipótesis

El uso de biorreactor Sistemas de inmersión temporal (SIT) incrementa la eficiencia de la propagación *in vitro* de plantas de Agrillo (*Rhus allophylloides*)

### 1.1.11 Objetivos

#### 1.1.11.1 Objetivo general

Establecer un protocolo para regeneración de plantas de Agrillo (*Rhus allophylloides*) por medio de biorreactores de inmersión temporal

#### 1.1.11.2 Objetivos particulares

- Establecer protocolo de desinfección de explante (semilla) de Agrillo
- Evaluar el efecto de reguladores de crecimiento en la germinación de semillas en medio semi sólido
- Establecer un protocolo de propagación *in vitro* de las plántulas de Agrillo
- Determinar los tiempos de inmersión temporal óptimos para la propagación *in vitro* de Agrillo

### 1.1.12 Bibliografía

- Babiker, A.G.T., Butler, L.G., Ejeta, G. and Woodson, W.R. (1993). Enhancement of ethylene biosynthesis and germination by cytokinins and 1 aminocyclopropane-l-carboxylic acid in *Striga asiatica* seeds. *Physiol. Plant* 89: 21–26.
- Barceló, C., *et al.* (2001). *Fisiología Vegetal*. Ed.Pirámide S.A. Madrid. 6ª Ed. 662.
- Barkley F.A. (1937). A monographic study of *Rhus* and its immediate allies in North and Central America, including the West Indies. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 24: 256-500.
- Bewley, J., y Black, M. (1994). *Seeds, physiology of development and germination*, Plenum Press, Nueva York.
- CONABIO. (2006). *Capital natural y bienestar social*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Chen, W.C., Chang, W.P. and Gow, J.T. (2008). Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Physiol Plant*, Vol. 30, Pp: 507-512.
- Elmqvist y Cox. (1996). The evolution of vivipary in flowering plants. *Oikos* 77, 3-9.
- Farrant, J.M., N.W. Pammenter y P. Berjak. (1993). Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation tolerant types. *Seed Sci. Res.* 3, 1-13.
- Fay, M.F. (1992). "Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods". *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 28: 1-4.
- Gao, F., Ayele, B.T. (2014). Functional genomics of seed dormancy in wheat: advances and prospects. *Front. Plant Sci.* 5, 458.
- George EF, Debergh PC. (2008). *Micropropagation: Uses and Methods*. En: George, EF, Hall M A, De Klerk GJ (Eds) *Plant propagation by tissue culture* 3rd Edition, pp. 29-64. Springer. Dordrecht.
- George, E.F. (2000). *Plant Propagation by tissue culture. Handbook and Directory of commercial laboratories*. Exegetics L.td. Eversely, Basingstoke, England.



- Hartmann, H., *et al.* (1997). Plant propagation: principles and practices, 6th ed., Prentice Hall, EUA.
- Hoekstra, F., A. Haigh, F. Tettero y T. van Roekel. (1994). Changes in soluble sugars in relation to desiccation tolerance in cauliflower seeds. *Seed Sci. Res.* 4, 143-147.
- Höxtermann, E. (1997). Cellular "Elementary Organisms" *in vitro*. The Early Vision of Gottlieb Haberlandt and its Realization. 100: 716-728.
- <https://xerces.org/pollinator-plants-for-winter-wildlife-january-2015/> Fecha de consulta: 21 de mayo de 2020.
- Kainer, K., M. Duryeaa, M. Malavasi, E. Rodrigues da Silva y J. Harrison. (1999). Moist storage of Brazil nut seeds for improved germination and nursery management. *Forest Ecol. Manag.* 116, 207-217.
- Karssen, C.M., S. Zagórsky, J. Kepczynski y S.P.C. Groot. (1989). Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Ann. Bot.* 63, 71-80.
- Kermode, A.R. y W.E. Finch-Savage. (2002). Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: Black, M. y H.W. Pritchard, editors. *Desiccation and survival in plants. Drying without dying*. CABI Publishing. pp. 149-184.
- Kucera, B., Cohn, M.A. and Leubner-Metzger, G. (2005). Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.* 15: 281–307.
- Leprince, O., G.A. Hendry y B.D. McKersie. (1993). The mechanism of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci. Res.* 3, 231-246.
- López-Encina, C., e I. González-Padilla. (1996). "A propósito de semillas". *Enc. en la Biol.*, 33: 3.
- Luna C, Collavino M, Mroginski L, Sansberro P. (2008). Identification and control of bacterial contaminants from *Ilex dumosa* nodal segments culture in a temporal immersion bioreactor system using 16S rDNA analysis. *Plant Cell. Tissue. Organ Cult.* 95:13-19.
- Luna Larios, A. (2015). Estudio de la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos acuosos de *Rhus virens* y *Rhus muelleri* contra *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* y Evaluación química de las plantas (Tesis de licenciatura). Universidad autónoma agraria antonio narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 34-42.
- Machakova I, Zazimalova E, George EF. (2008). Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. En: George E, Hall M, De

- Klerk G-J (Eds) Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, pp. 175-204 Springer. Dordrecht.
- Matilla, A.J. y M.A. Matilla-Vázquez. (2008). Involvement of ethylene in seed physiology. *Plant Sci.* 175, 87–97.
  - McAlister B, Finnie J, Watt MP, Blake way FC. (2005). Use of temporary immersion bioreactor system (RITA) for the production of commercial Eucalyptus clones at Mondi Forests (SA). *Plant Cell. Tissue. Organ Cult.* 81: 347-358.
  - McGregor S.E. (1976). Insect pollination of cultivated crop plants. - Agriculture Handbook No. 496, USD A- ARS, U.S. Gov. Print. Office, Washington.
  - Meiners Ochoa, M., y L. Hernández López. (2007). Únicamente en México especies endémicas y las plantas de Jalisco. *CONABIO. Biodiversitas* 71:10-15
  - Muñoz, R. (2018). La propagación in vitro de plantas con sistemas de inmersión temporal. Una tecnología apropiada para la agricultura sustentable. *Tehkné*, 21(3):42-50.
  - Murashige, t.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
  - Nkang, A. (2002). Carbohydrate composition during seed development and germination in two sub-tropical rainforest tree species (*Erythrina caffra* and *Guilfoylia monostylis*). *J. Plant Physiol.* 159 (5), 473-483.
  - Pierik, R.L.M. (1993). "Micropropagation: Technology and Opportunities". En: *Plant biotechnology commercial prospects and problems* (Prakash, J.; Pierik R.L.M., Eds.), Science Publishers, Inc., Lebanon, pp. 9-22.
  - Preil, W. (2005). General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. Hvoslef-Eide AK, Preil W (Ed) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. p 1-18. Springer, Dordrecht.
  - Quintana-camargo, Martín, Guzmán-rodríguez, Luis Felipe, Pichardo-gonzález, Juan Manuel y Reyes-guerra, Juan Alfonso. (2016). Evaluación de calidad de semilla de agrillo (*Rhus trilobata*) del municipio de Arandas, Jalisco, México. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias.* 3-6: 43-47.
  - Rowe D.B., Blazích F.A. (2002). *Rhus* L.: sumac - In: BON- NER F.T., *Woody plant seed manual*. Washington, DC, U.S. Department of Agriculture, Forest Service (Producer).
  - Ruter, J.M. (2008). Cloning plants by rooting stem cuttings. In: Beyl, C. A. & Trigiano, R. N. (eds.) *Plant propagation concepts and laboratory exercises*. Florida. CRC Press: 177-188.

- SEMARNAT. (2018). México, biodiversidad que asombra. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales Recuperado de <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/mexico-biodiversidad-que-asombra>
- Sierra Ryne. G. Mazza. (2007). Biological activities of extracts from sumac (*Rhus* spp.): A review. Original Paper. Plant Foods Hum Nutr. Canada. 62:165 - 175.
- Tisserat, B, Esan E y Murashige T. (1979). Somatic embryogenesis in angiosperms. Hort. Rev. 1: 1-78.
- Van Wyk BE, Wink M. (2004). Medicinal plants of the world. Timber Press. Portland. OR. USA.
- Wang, X., X. Li, J. Meisenhelder, T. Hunter, S. Yoshida, T. Asami y J. Chory. (2005). b. Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1. Develop. Cell 8, 855-865.
- Watt MP, Banasiak M, Nicholson T, McAlister B. (2006). Strategies for the selection of uncontaminated Eucalyptus explants for shoot multiplication in a temporary immersion system (RITA) in a commercial laboratory. South Afr. For. J. 206:13-22.
- Yeung, E, Rahman H y Thorpe T. (1996). Comparative Development of zygotic and microspore-derived embryos in Brassica napus L. cv Topas. I. Histodifferentiation Int. J. Plant Sci. 157(1): 27-39.

## 2. CAPÍTULO 2.

### 2.1 Germinación de semillas de agrillo (*Rhus allophylloides*) en condiciones *in vitro*

#### 2.1.1 Resumen

En el presente capítulo se evaluaron el efecto de bencilaminopurina (BAP) y ácido indol butírico (AIB), para la germinación de semillas de *Rhus allophylloides* en condiciones *in vitro*, se realizó un protocolo de desinfección para el establecimiento en medio semisólido MS (adicionado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 3 g L<sup>-1</sup> de Gelrite® a diferentes concentraciones de BAP (0, 0.5, 1, 1.5, 2 mg L<sup>-1</sup>) solo y combinado con AIB (0.5 mg L<sup>-1</sup>), durante 15 días se llevó a cabo la evaluación del porcentaje de germinación y se calculó el índice de velocidad de germinación (IVG). Se obtuvo un porcentaje de germinación en el control de 45.8%, mientras que la mayor germinación se obtuvo en los tratamientos que tenían solamente BAP (79.2-87.5 %), en los tratamientos combinados con AIB 0.5 g L<sup>-1</sup>, disminuyó el porcentaje de germinación (58.3-75%), en la evaluación el mejor porcentaje de germinación se obtuvo con el tratamiento T2 (0.5 mg L<sup>-1</sup>) con 87.5% y el valor más alto de IVG (1.4). La finalidad de estos experimentos fue encontrar la mejor combinación de reguladores de crecimiento para promover la germinación *in vitro* de agrillo.

**Palabras clave:** *Rhus allophylloides*, semilla, reguladores de crecimiento, germinación *in vitro*

#### 2.1.2 Introducción

Una de las técnicas biotecnológicas es el establecimiento de embriones cigóticos en condiciones asépticas en cultivo *in vitro*. Esta estrategia nos permite acelerar y facilitar la germinación de las semillas en condiciones óptimas, la cual incrementa el porcentaje de germinación a diferencia de los métodos

convencionales. Dentro de esta técnica se pueden eliminar diversos componentes para inducir la pronta germinación de semillas maduras en letargo, superando las restricciones ocasionadas por la cubierta de la semilla o del endospermo (Hartmann, 1992), con el fin de obtener una planta viable (Pierik, 1990).

Las citoquininas son empleadas para inducir el crecimiento de brotes en muchas especies de plantas, ya que se encargan de promover la división celular y promover la expansión celular (Nikolic *et al.*, 2006). Siendo la 6-bencilaminopurina (BAP), una citoquinina que se deriva de la adenina, su función es promover el crecimiento, división y elongación de las células. Además de promover la germinación y regular el crecimiento de las raíces e inhibir el proceso de envejecimiento de las hojas.

Las auxinas son reguladores de crecimiento que pueden promover el alargamiento y división celular *in vivo* a concentraciones tan bajas como  $0.01 \mu\text{mol L}^{-1}$ . El ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA), una auxina sintética, se utiliza ampliamente en horticultura para estimular la formación de raíces adventicias. Otras auxinas sintéticas como el ácido indol butírico (AIB) y el ácido indol-3-acético (AIA) se utilizan para la formación de raíces a partir del tallo, lo cual es una práctica común para el enraizamiento, así como la germinación *in vitro* de semillas y crecimiento de plántulas en algunas especies (Acosta *et al.*, 2000; Bandurski *et al.*, 1993).

Se reporta que la semilla cuenta con una cubierta endurecida que dificulta la germinación y propagación de la especie, además presenta una baja calidad de las semillas debido a los daños asociados principalmente por insectos. Otro problema es el constante crecimiento de la zona urbana y el cambio en el uso de suelo, que han afectado significativamente las zonas naturales de hábitat de la especie (Quintana-Camargo, 2016).

Por lo anterior es indispensable generar estrategias de propagación, conservación y replantación de la especie. Por lo que en este trabajo se enfoca a encontrar la concentración y combinación de reguladores de crecimiento para

promover la germinación de semillas, evaluando la bencilaminopurina (citoquinina) y el ácido indol butírico (auxina). Por lo que en este trabajo se evaluó el efecto del BAP y AIA en la germinación de semillas cigóticas de agrillo *in vitro* en medio semisólido, con el objetivo de determinar la mejor combinación de reguladores de crecimiento para incrementar el porcentaje y velocidad de germinación de semillas.

### **2.1.3 Metodología**

#### **2.1.3.1 Material vegetal.**

Se colectaron frutos en la región de Arandas, Jalisco, México. El fruto de agrillo fue despulpado para obtener la semilla, los cuales se lavaron con detergente comercial y se sometieron a un proceso modificado de desinfección en condiciones asépticas (Flores *et al.*, 2008). Las semillas se colocaron en una solución de fungicida; benomilo  $1\text{ g L}^{-1}$  por 20 minutos, se efectuaron dos lavados con agua estéril, posteriormente se realizó una inmersión en cloro comercial al 30% por 30 min, dos lavados con agua estéril, después se colocaron en alcohol al 70° durante 3 minutos y finalmente se realizaron dos lavados con agua estéril.

#### **2.1.3.2 Experimento del efecto de reguladores de crecimiento en la velocidad y porcentaje de germinación de semillas.**

Se colocaron las semillas desinfectadas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con  $3\text{ L}^{-1}$  de Gelrite®, sacarosa 3% (p/v), se ajustó el medio de cultivo a un pH de 5.8 y fueron esterilizados durante 20 minutos en una autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  a 1.5 atmósferas de presión. Para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento en la germinación del agrillo, se agregaron diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y ácido indol butírico (AIB) para cada tratamiento (T) como se indica a continuación: T1. Control, T2.  $0.5\text{ mgL}^{-1}$  BAP, T3.  $1\text{ mgL}^{-1}$  BAP, T4.  $1.5\text{ mgL}^{-1}$  BAP, T5.  $2.0\text{ mgL}^{-1}$  BAP, T6.  $0.5\text{ mgL}^{-1}$  AIB, T7.  $0.5\text{ mgL}^{-1}$  BAP +  $0.5\text{ mgL}^{-1}$  AIB, T8.  $1\text{ mgL}^{-1}$  BAP +  $0.5\text{ mgL}^{-1}$  AIB, T9.  $1.5\text{ mgL}^{-1}$  BAP +  $0.5\text{ mgL}^{-1}$  AIB, T10.  $2\text{ mgL}^{-1}$  BAP +  $0.5\text{ mgL}^{-1}$  AIB. La germinación de semillas se registró diariamente durante 15 días, se mantuvieron a  $24\pm 2^{\circ}$  en condiciones de oscuridad, se consideró que la semilla estaba

germinada cuando se apreciaba la salida de la radícula. Se calculó el porcentaje de germinación y el índice de velocidad de germinación IVG (Maguire, 1962). El proceso de germinación de semillas para la formación de plántulas se clasificó en cinco etapas de desarrollo (cuadro 2.1). Las semillas se consideraron germinadas, cuando se observó el rompimiento del endocarpio por el crecimiento radicular del embrión cigótico (etapa 1, Figura 2.1B). El porcentaje de germinación de semillas para cada tratamiento se calculó dividiendo la cantidad de semillas en etapa 1 entre la cantidad total de semillas por cien.

### **2.1.3.3      Diseño experimental y análisis de datos.**

Se empleó un diseño experimental completamente al azar los datos presentados corresponden a 4 repeticiones con 6 semillas cigóticas para cada tratamiento. Los datos obtenidos durante el experimento se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias se determinó por la prueba estadística LSD ( $P < 0.05$ ).

## 2.1.4 Resultados

### 2.1.4.1 Germinación de semilla

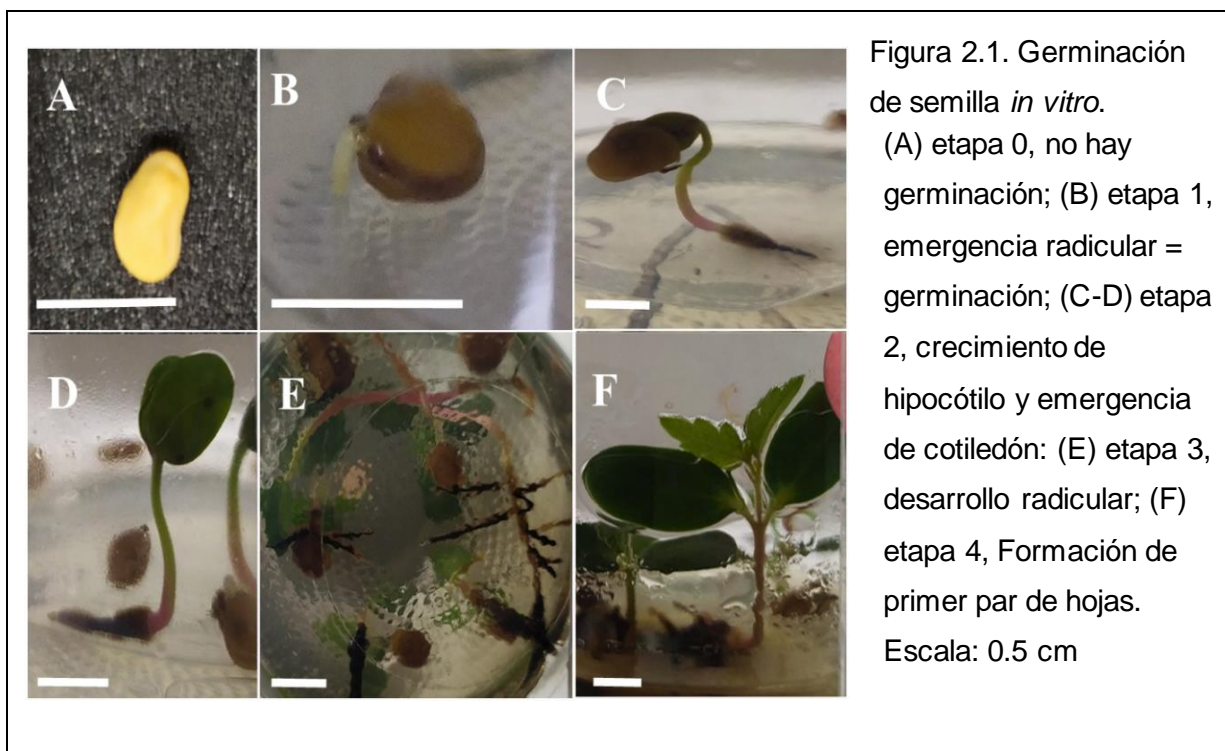
Se establecieron las etapas de desarrollo morfológico de *R. allophylloides* desde el embrión hasta las plántulas (figura 2.1 A – F). Durante el proceso de germinación los primeros días, el endocarpio endurecido comenzó a abrirse debido a la hidratación y las condiciones de alta humedad (aproximadamente 95% HR) en los medios de cultivo.

Cuadro 2.1 Germinación de semillas y etapas de formación de plántulas de *Rhus allophylloides*.

Etapa	Descripción
0	No hay crecimiento del embrión, endocarpio endurecido
1	Emergencia radicular (germinación)
2	Crecimiento y emergencia de cotiledones
3	Desarrollo radicular
4	Formación de primeras hojas verdaderas

La germinación de semillas de *R. allophylloides* comenzó con la emergencia radicular del embrión a partir del endocarpio (etapa 1; ver cuadro 2.1), en un tiempo aproximado de 5 días después de la siembra (figura 2.1B). Después de la germinación, se desarrolló el hipocótilo y los cotiledones al día 15 (etapa 2, ver cuadro 2.1, figura 2.1C-D) y al mismo tiempo se desarrolló el sistema radicular (etapa 3, ver cuadro 2.1 y figura 2.1E). Posteriormente se formaron las primeras hojas verdaderas aproximadamente al día 30 después de siembra (etapa 4, ver cuadro 2.1 y figura 2.1F).





#### 2.1.4.2 Evaluación de reguladores de crecimiento

Como resultados en la adición de reguladores de crecimiento en el medio, durante el proceso de germinación se observó que el control presentó el menor porcentaje (45.8%) y el menor índice de velocidad de germinación (0.73), ver figura 2.2; cuadro 2.2. Esta respuesta de baja germinación en el presente estudio probablemente se deba a la ausencia de reguladores de crecimiento en el medio, las cuales pueden ejercer una influencia positiva en la germinación de las semillas como se ha descrito en diferentes especies tal es el caso de *Dendrobium chrysotoxum*, donde se demostró un aumento en el porcentaje de germinación 1.17 veces utilizando cantidades de 2.5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.8 mg L<sup>-1</sup> AIB (Potshangbam *et al.*, 2014). La combinación de BAP (0.5 - 2 mg L<sup>-1</sup>) + AIB 0.5 mg L<sup>-1</sup> (T7 a T9) promovió el porcentaje de germinación entre 1.4 a 1.5 veces más, en el caso de *Hylocereus undatus* en un medio complementado con BAP 1 mg L<sup>-1</sup> + AIB 0.5 g L<sup>-1</sup> aumento 1.6 veces el porcentaje de germinación (Vishnupriya *et al.*, 2019).

Cuadro 2.2 Porcentaje de germinación en índice de velocidad de germinación (IVG) hasta el día 15

Tratamiento	%Germinación	IVG
T1	45.8±0.50 <sup>c</sup>	0.73
T2	87.5±0.33 <sup>a</sup>	1.40
T3	83.3±0.38 <sup>ab</sup>	1.33
T4	83.3±0.38 <sup>ab</sup>	1.33
T5	79.1±0.41 <sup>ab</sup>	1.26
T6	75.0±0.44 <sup>ab</sup>	1.20
T7	62.5±0.49 <sup>abc</sup>	1.00
T8	70.8±0.46 <sup>abc</sup>	1.13
T9	62.5±0.49 <sup>abc</sup>	1.00
T10	58.3±0.50 <sup>bc</sup>	0.93

\*En el cuadro se presenta el valor de las medias  $\pm$  desviación estándar (SD). Letras diferentes denotan diferencia significativa según la prueba de LSD ( $p < 0.05$ ).

Se obtuvo una influencia positiva con la adición de BAP sin combinación con AIB (T2 a T5) aun en la mayor concentración. Un efecto similar se observó en la germinación de semillas de *Lotus corniculatus* en el que se demostró un porcentaje de germinación de 30% (sin reguladores de crecimiento) y aumentaba hasta 80% de germinación en presencia de 0.05 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Ibisch, 2003). También se ha reportado en semillas chile pimiento *Capsicum annum L.* un aumento en la velocidad de germinación *in vitro* cuando el medio MS es suplementado con BAP de 1.5 mg L<sup>-1</sup> (Yogesh *et al.*, 2018).

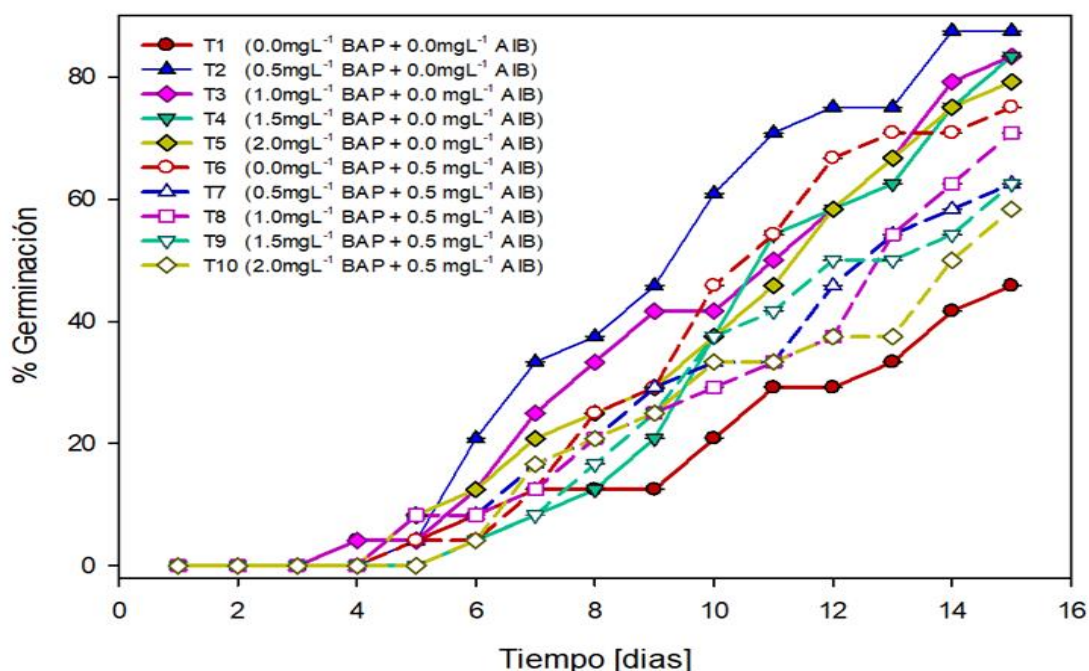


Figura 2.2 Germinación acumulada de semillas de agrillo. Influencia del efecto de BAP a AIB en la germinación durante 15 días

Los resultados para el IVG, ver cuadro 2.2, que representa el número de semillas germinadas con respecto al día. Se muestra una mayor velocidad de germinación en los tratamientos con BAP resultando el mayor T2. BAP 0.5 mg L<sup>-1</sup>; con respecto al control. Por lo que se puede observar la adición de reguladores de crecimiento para la germinación *in vitro* de semillas de agrillo resulta positivo en aumento de porcentaje y velocidad de germinación.

### 2.1.5 Conclusiones

La adición de BAP al medio semisólido en concentraciones de 0.5 a 2 mg L<sup>-1</sup> resultó en un mayor porcentaje y velocidad de germinación a diferencia de su combinación con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

El uso de reguladores de crecimiento tiene un efecto positivo en la germinación de semillas de agrillo, con un aumento de hasta 41.7% en el tratamiento con 0.5 mgL<sup>-1</sup> BAP con respecto al control, los resultados obtenidos demuestran la adición de los reguladores de crecimiento evaluados promueven el porcentaje y la velocidad de germinación *in vitro* en el cultivo de agrillo.

### 2.1.6 Bibliografía

Acosta, E.M.; B. J. Sánchez y A.M. Bañón. (2000). "Auxinas". Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcon.

Bandurski, R.S., J.P. Slovi y J.D. Cohen. (1993). "Auxinas". Fisiología y Bioquímica Vegetal, Azcon-Bieto y Talon (Eds.) Interamericana-McGraw-Hill, 285-300 pp.

Flores García, Andrés, & Álvarez Moctezuma, José Guadalupe, & Rodríguez de la O, José Luis, & Corona Ambris, Alejandro. (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl.. Foresta Veracruzana, 10(2),27-33.

Hartmann HT, Kester DE. (1992). Propagación de plantas. Principios y prácticas. Trad. A. M. Ambrosio. Sexta reimpresión. Compañía Editorial Continental, S. A. De C. V. México. 760 pp.

Ibisch PL, Mérida G. (2003). Biodiversidad: La riqueza de Bolivia. Ed. FAN-Bolivia. Santa Cruz de la Sierra. 638 pp.

Maguire J.D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop Science 2: 176-177.

Murashige, t.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15: 473-497.

Nikolic R, Mitic N, Miletic R., y Neskovic M. (2006). Effects of Cytokinins of *in vitro* seed germination and early seedling Morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. J. Plant Growth Regul 25:187-194.

Pierik RLM. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. (1990). Madrid: Editorial Multiprensa. 326 pp

Potshangbam N and Leimapokpam T. (2014). Establishment of an Efficient *In Vitro* Regeneration Protocol for Rapid and Mass Propagation of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. Using Seed Culture. Hindawi Publishing Corporation Scientific World Journal.

Quintana-Camargo, Martín, Guzmán-rodríguez, Luis Felipe, Pichardo-González, Juan Manuel y Reyes-guerra, Juan Alfonso. (2016). Evaluación de calidad de semilla de agrillo (*Rhus trilobata*) del municipio de Arandas, Jalisco, México. Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias.

Vishnupriya J, Thamaraiselvi SP, Hemaprabha K and Kavitha C. (2019). Influence of growth regulators on *in vitro* seed germination of dragon fruit (*Hylocereus undatus*). International Journal of Chemical Studies. 7(3).

Yogesh K, Patil, V, Vijay T, Nitesh B, Rahul K and Vaibhav S. (2018). Influence of Plant Growth Regulators on Seed Germination and Regeneration of Shoots and Roots in Chili (*Capsicum annum* L.). Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 7(02).

### 3. CAPÍTULO 3.

#### 3.1 Establecimiento de protocolo de propagación de agrillo (*Rhus allophylloides*) en condiciones *in vitro*

##### 3.1.1 Resumen

La micropropagación fue establecida a partir del cultivo de microesquejes obtenidos de plántulas de dos meses de edad generadas en condiciones *in vitro*. En este capítulo se inició con la optimización de las condiciones y evaluación de los reguladores de crecimiento para la multiplicación *in vitro* de plantas del agrillo. Se establecieron explantes (microesquejes) en medio de cultivo MS y se evaluaron condiciones de intensidad de luz e intercambio gaseoso (sistemas cerrados/semiabiertos) que afectan el desarrollo de la plántula. Los mejores parámetros de desarrollo de la plántula se presentaron en el sistema semiabierto y con  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPF de intensidad de luz, por lo que se utilizaron dichas condiciones para evaluar el efecto de citoquinina (BAP) y auxina (AIB) en los diferentes reguladores de crecimiento para la generación de brotes y raíz en el cultivo *in vitro*, obteniéndose la mejor respuesta con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP con 2.83 número de brote y solo el TM6 con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB a los 30 días de cultivo iniciaba la generación de raíz. Por lo cual se estableció un experimento con diferentes concentraciones de BAP, AIB y ANA (ácido naftalenacético) para inducir la generación del sistema radicular, el mejor tratamiento fue el TR2 con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB y  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, presentando un 70% de explantes con raíz y 1.34 cm longitud de raíz.

**Palabras clave:** *Rhus allophylloides*, intercambio gaseoso, reguladores de crecimiento, cultivo *in vitro*

##### 3.1.2 Introducción

El fruto del agrillo tiene una importancia económica en la región Altos de Jalisco, es utilizado para la elaboración de diversos productos alimenticios, actualmente se tiene la problemática que al ser una especie silvestre se dificulta la ubicación de la planta y recolección del fruto, por lo anterior se propone

generar estrategias de propagación, encontrando una alternativa en el cultivo *in vitro*.

Para el cultivo *in vitro* se deben mantener condiciones ambientales favorables semejantes a las naturales. La luz, la temperatura y la humedad relativa son los principales factores del ambiente que inciden sobre los cultivos (Vidalie, 1986). Para tener una respuesta para el desarrollo *in vitro* se tiene la influencia de otros tres factores principales: la fisiología del donante, las manipulaciones *in vitro* y la fisiología del estrés en plantas *in vitro* (Benson, 2000). Un factor de estrés provoca que las células vegetales puedan dividirse dando una desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células indiferenciadas denominada callo.

El comportamiento de muchos cultivos depende de la calidad, intensidad y fotoperíodo de la luz que reciben, dado que varias enzimas involucradas en el desarrollo y en el metabolismo secundario son influenciadas por la luz. La mayoría de los cultivos desarrollan a una intensidad luminosa entre 5 a 25 W/m<sup>2</sup> (1000 a 5000 lux). Si bien la calidad de la luz puede determinar diferentes respuestas morfogénicas, en general se utiliza luz blanca. El fotoperíodo habitualmente utilizado es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, aunque algunos cultivos requieren oscuridad (Marín, 1993).

El cultivo de tejidos puede promover efectos inhibitorios interactivos entre las hormonas exógenas y endógenas que puede estar asociada con la sobreproducción y acumulación de etileno en el recipiente de cultivo. El etileno está involucrado en muchas respuestas morfogénicas (Kumar, 1998) que pueden promover e inhibir la morfogénesis *in vitro*. Las tasas de crecimiento, desarrollo y muchas de las características fisiológicas y morfológicas de las plantas formadas *in vitro* están influenciadas por el ambiente físico, químico y gaseoso de los recipientes (Kozai, 1992). Por lo tanto, el estudio y control del ambiente de los cultivos también incidirá positivamente en la optimización de los procedimientos de micropropagación.

Los medios de cultivo *in vitro* pueden contener sustancias sintéticas similares a las hormonas vegetales denominadas reguladores de crecimiento vegetal, los cuales son importantes en el metabolismo, distribución de los solutos, en el crecimiento y fisiología de la planta regulando la expresión genética interna al igual que las hormonas naturales (Bisht, 2018; George *et al.*, 2008).

Para el cultivo *in vitro* los reguladores de crecimiento vegetal más importantes son las auxinas y citoquininas, porque controlan la ramificación de los brotes, la formación y mantenimiento de los meristemos, la formación de raíces y otras funciones (George *et al.*, 2008; Su, Liu & Zhang, 2011).

Las citoquininas son hormonas que juegan un papel central en la regulación del ciclo celular de la planta y en numerosos procesos de desarrollo. Skoog y Miller (1965) descubrieron las citoquininas como factores que promueven la división celular (citocinesis). La primera citoquinina descubierta fue un derivado de adenina (aminopurina) llamado kinetina (6-furfurilaminopurina), que se aisló como un producto de degradación del ADN. La primera citoquinina natural común identificada se purificó a partir de granos de maíz inmaduros y se denominó zeatina (6- (4-hidroxi-3-metilbut-2-enilamino) purina). Las citoquininas están presentes en todos los tejidos vegetales. Son abundantes en la punta de la raíz, brote de ápice y semillas inmaduras. Su concentración endógena está en el rango bajo de mg / L (Hartmann *et al.*, 2007).

Aunque hay varias especies que no necesitaban hormona exógena en el cultivo inicial, pero la mayoría de las plantas necesitan poca cantidad de citoquinina para apoyar el crecimiento del meristemo (Dixon y Gonzales, 1995).

Las citoquininas que se utilizan principalmente en el cultivo de tejidos vegetales son BAP (6-bencilamino purina). Esto se debe a que BAP es más estable que otras citoquininas, más difícil de oxidar por la luz, más barato y fácil de obtener (Koning, 1994). BAP también es más efectivo porque tiene más capacidad para promover otras síntesis hormonales (Uranbey, 2004). El uso de BAP en plantas generalmente varía de 1.0 a 3.0 mg / L. Si la concentración es

demasiado alta, puede causar un retraso en el brote, lo que impide el crecimiento de la planta, pero el efecto variará según las especies (George, 2000).

Se hace mención que, en la etapa inicial de cultivo, la auxina generalmente no es necesaria si se compara con la citoquinina, pero si se agrega en una pequeña cantidad, combinada con la aplicación de citoquinina, puede producir un resultado positivo en el desarrollo del sistema radicular (Hall, 1999). La proporción de auxina a citoquinina determina el tipo de cultivo establecido o el tipo de regeneración (Herman, 2006).

La proporción generalmente difiere según los géneros y las especies en términos de sensibilidad de la planta a las hormonas. Razdan (2005) hace referencia en la aplicación de la hormona en etapas críticas en el cultivo de meristemos y la punta del brote.

La proporción de auxina y citoquininas es un determinante en la formación de meristemos, por lo que es fundamental encontrar el equilibrio hormonal para estimular la formación de brotes y raíces. Cabe mencionar que dependiendo del género, especie y cultivar, así como la etapa de desarrollo de la planta madre donde se toma el explante inicial para el cultivo *in vitro*, así como los niveles hormonales endógenos propios del explante y su interacción con los reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo son factores que van a afectar la respuesta morfogénica del tejido vegetal en cultivo *in vitro*, por lo que es importante realizar evaluaciones con los diferentes reguladores de crecimiento variando las concentraciones y con la finalidad de encontrar la mejor combinación de reguladores de crecimiento para el método de propagación elegido para la especie en particular.

La auxina es una hormona que participa en el alargamiento de la raíz y la formación de raíz adventicia. (Ameena y Khaleed, 2009) La auxina también causa senescencia de frutos y hojas, inhibiendo el crecimiento lateral de los brotes e inhibiendo la multiplicación de brotes. En el cultivo de tejidos, la auxina se usa principalmente para promover el crecimiento de la raíz de la planta y la raíz adventicia (Razdan, 2005). Al igual que otras hormonas, su concentración



diferente también resulta en resultados diferentes dependiendo de las especies y géneros de plantas.

Un mejor sistema de enraizamiento proporcionará a la planta una mayor capacidad para absorber nutrientes. La auxina puede causar senescencia de frutos y hojas e inhibir el crecimiento lateral de los brotes. Esto se debe a que una alta concentración de auxina puede estimular la producción de etileno, que causa todos los síntomas anteriores (Jaafar *et al*, 1999). En el cultivo de tejidos vegetales, la auxina más utilizada es IAA (ácido indol-3-acético) y NAA (ácido  $\alpha$ -naftaleno acético). IAA es la auxina nativa que se produce naturalmente, mientras que NAA es la auxina producida sintéticamente. Sin embargo, IAA es más inestable porque su estructura química tiende a modificarse fácilmente. George (2000) declaró que NAA se usa generalmente en cultivo de células vegetales en un rango de concentración de 0.01-1.0 mg / L para inducir el enraizamiento. Por encima de esta concentración, el enraizamiento puede inhibirse debido a la formación excesiva de callos.

En el caso de la multiplicación *in vitro* en plantas del género *Rhus sp.* ha sido poco estudiada, se encuentran trabajos que abordan estudios sobre el cultivo de tejidos de este género (A. Safarnejad, 2011; Borschevskyi, 2013), y hasta el momento no se han encontrado trabajos que reporten la micropropagación de *Rhus allophylloides*. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue optimizar las condiciones de vitroplantas de agrillo, así como determinar el efecto de los reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento en condiciones *in vitro* de plantas de *Rhus allophylloides*. Con el fin de establecer un protocolo de regeneración de plantas de Agrillo.

### **3.1.3 Metodología**

#### **3.1.3.1 Material vegetal.**

Se colectaron frutos en la región de Arandas, Jalisco, México. El fruto de agrillo fue despulpado para obtener la semilla, los cuales se lavaron con detergente comercial y se sometieron a un proceso modificado de desinfección

en condiciones asépticas (Flores *et al.*, 2008). Las semillas se colocaron en una solución de fungicida; benomilo  $1\text{ g L}^{-1}$  por 20 minutos, se efectuaron dos lavados con agua estéril, posteriormente se realizó una inmersión en cloro comercial al 30% por 30 min, dos lavados con agua estéril alcohol al 70° durante 3 minutos y finalmente se realizaron dos lavados con agua estéril. Para la germinación de semillas se mantuvieron 15 días a  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$  en condiciones de oscuridad.

### **3.1.3.2 Experimento de la evaluación de sistemas abiertos/cerrados e intensidad de luz.**

Se realizó la germinación *in vitro* de semillas de agrillo, después de 60 días se generaron plántulas *in vitro* de las cuales se extrajeron secciones de entrenudos (microesquejes) con 3 nudos iniciales para cada explante. Para la evaluación del desarrollo de plantas en medio semisólido se colocaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con  $3\text{ g L}^{-1}$  de Gelrite®, sacarosa 3% (p/v) y polivinilpirrolidona (PVP)  $1\text{ g L}^{-1}$ , se ajustó el medio de cultivo a un pH de 5.8 y fueron esterilizados durante 20 minutos en una autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  a 1.5 atmósferas de presión.

Dentro de los sistemas establecidos se evaluaron los siguientes tratamientos: TC1. Sistema cerrado, con  $57\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  PPFD (Densidad de flujo de fotones fotosintético); TC2. Sistema cerrado, con  $32\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  PPFD; TC3. Sistema semiabierto (intercambio de gases), con  $32\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  PPFD y TC4. Sistema semiabierto, con  $57\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  PPFD. Se realizaron evaluaciones a los 30 y 60 días en los diferentes tratamientos, se consideraron las siguientes variables de desarrollo en los explantes: longitud del explante (LE), número de hojas (NH), formación de raíz (R) y un factor adverso para el desarrollo como es la formación de callo (C).

### **3.1.3.3 Determinación de peso fresco y peso seco de los diferentes sistemas cerrados/semiabiertos e intensidad de luz.**

Se realizó un análisis de las plántulas para determinar su peso fresco y seco a los 30 y 60 días del cultivo *in vitro*, se tomaron 4 explantes por cada tratamiento, las cuales se colocaron individualmente en una balanza analítica para determinar el peso fresco; después se colocaron en un horno de secado a 50°C por 48hrs. Para posteriormente tomar el peso seco de cada muestra.

### **3.1.3.4 Experimento de la evaluación de reguladores de crecimiento en la multiplicación *in vitro*.**

Se realizó la germinación *in vitro* de semillas de agrillo después de 60 días se obtuvieron plántulas *in vitro* de las cuales se extrajeron entrenudos (microesquejes) con dos nudos por explante y con un tamaño aproximado de 1cm para la evaluación del desarrollo de plantas en medio semisólido. Se colocaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 3 g L<sup>-1</sup> de Gelrite®, sacarosa 3% (p/v) y polivinilpirrolidona (PVP) 1 g L<sup>-1</sup> se ajustó el medio de cultivo a un pH de 5.8 y fueron esterilizados durante 20 minutos en una autoclave a 121°C a 1.5 atmósferas de presión.

Se evaluaron diferentes tratamientos para observar el efecto de los reguladores de crecimiento en el desarrollo del agrillo, se agregaron diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y ácido indol butírico (AIB) para cada tratamiento para la multiplicación (TM) como se indica a continuación:

TM1. Control, TM2. 0.5 mgL<sup>-1</sup> BAP, TM3. 1 mgL<sup>-1</sup> BAP, TM4. 1.5 mgL<sup>-1</sup> BAP, TM5. 2.0 mgL<sup>-1</sup> BAP, TM6. 0.5 mgL<sup>-1</sup> AIB, TM7. 0.5 mgL<sup>-1</sup> BAP + 0.5 mgL<sup>-1</sup> AIB, TM8. 1 mgL<sup>-1</sup> BAP + 0.5 mgL<sup>-1</sup> AIB, TM9. 1.5 mgL<sup>-1</sup> BAP + 0.5 mgL<sup>-1</sup> AIB, TM10. 2 mgL<sup>-1</sup> BAP + 0.5 mgL<sup>-1</sup> AIB. Las variables de desarrollo fueron: longitud (L), número de brotes (NB), número de hojas (NH), generación de raíz (presencia o ausencia), se llevó a cabo un subcultivo a los 30 días y la evaluación se realizó

a los 30 y 60 días del establecimiento, se mantuvieron a  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$  en condiciones de fotoperiodo 16 hrs luz y 8 hrs oscuridad.

### **3.1.3.5 Experimento de evaluación de reguladores de crecimiento para el enraizamiento *in vitro* de explantes de agrillo.**

Se realizó la germinación *in vitro* de semillas de agrillo, después de 60 días se generaron plántulas *in vitro* de las cuales se extrajeron secciones de entrenudos (microesquejes) con 3 nudos cada explante para la evaluación del desarrollo de plantas en medio semisólido. Se colocaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% (v/v) de su concentración, suplementado con  $3\text{ g L}^{-1}$  de Gelrite®, sacarosa 3% (p/v) y polivinilpirrolidona (PVP)  $1\text{ g L}^{-1}$ , se ajustó el medio de cultivo a un pH de 5.8 y fueron esterilizados durante 20 minutos en una autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  a 1.5 atmósferas de presión. Se establecieron tratamientos con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, empleando dos tipos de auxinas, ácido indol butírico (AIB) y ácido naftalenacético (ANA), además se adicionó la citoquinina la 6-bencilaminopurina (BAP), los tratamientos de la etapa de enraizamiento (TR) se indican a continuación: TR1. Control, TR2.  $0.5\text{ mgL}^{-1}$  AIB +  $0.2\text{ mgL}^{-1}$  ANA, TR3.  $1\text{ mgL}^{-1}$  AIB +  $0.2\text{ mgL}^{-1}$  ANA, TR4.  $0.5\text{ mgL}^{-1}$  AIB +  $0.2\text{ mgL}^{-1}$  ANA +  $0.01\text{ mgL}^{-1}$  BAP, TR5.  $1\text{ mgL}^{-1}$  AIB +  $0.2\text{ mgL}^{-1}$  ANA +  $0.01\text{ mgL}^{-1}$  BAP.

### **3.1.4 Diseño de experimento y análisis de datos**

#### **3.1.4.1 Evaluación de intensidad de luz y aireación (sistemas cerrados y semiabiertos).**

Se realizó un diseño experimental completamente al azar los datos presentados corresponden a cuatro replicados, cada uno con 3 explantes por tratamiento. El peso seco y peso fresco se determinó por cuatro explantes para cada tratamiento. Los datos obtenidos durante el experimento se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias se determinó por la prueba de LSD ( $P < 0.05$ ), ver cuadro 3.1

#### **3.1.4.2 Evaluación de reguladores de crecimiento en la multiplicación de plantas de agrillo en cultivo *in vitro*.**

Se realizaron evaluaciones quincenales en los diferentes tratamientos, realizándose un subcultivo a los 30 días. Se hizo una medición en cm de la longitud y se contabilizó si hubo generación de brotes, raíz y la cantidad de hojas. Se empleó un diseño experimental completamente al azar, los datos presentados corresponden a 12 repeticiones por tratamiento. Los datos obtenidos durante el experimento se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias se determinó por la prueba de LSD ( $P < 0.05$ ), ver cuadro 3.2. El desarrollo de las plantas a lo largo del periodo de evaluación se muestra en las (figuras 3.3 a 3.6).

#### **3.1.4.3 Evaluación de enraizamiento *in vitro* de agrillo.**

Se realizó una evaluación a los 30 días en los diferentes tratamientos, donde se registró la generación de callo, raíz y longitud de raíces. El diseño experimental fue completamente al azar, los datos presentados corresponden a 10 repeticiones por tratamiento. Los datos obtenidos durante el experimento se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias se determinó por la prueba de LSD ( $P < 0.05$ ), ver cuadro 3.3 El desarrollo de las plantas a lo largo del periodo de evaluación se muestra en la (figura 3.7).

### **3.1.5 3.3 Resultados y discusión**

#### **3.1.5.1 Evaluación de intensidad de luz y aireación (sistemas cerrados y semiabiertos)**

Durante la evaluación los tratamientos TC1, TC2 y TC4 en el día 30 de cultivo presentaron 2.13, 2.6 y 2.43 cm de longitud del explante respectivamente, mientras que en TC3 se presentó 3.0 cm de longitud del explante presentando diferencia significativa con TC1. A los 60 días de cultivo los tratamientos TC1 y TC2 tuvieron un incremento menor de 1.38, mientras que los tratamientos TC3 y

TC4 son los que presentaron mayor incremento en la longitud del explante de 1.42 y 1.38 respectivamente. Se registró la generación de nudos en los tratamientos TC2, TC3 y TC4, no hubo diferencia significativa al día 30. Sin embargo, al día 60 se observó que en TC1 y TC2 no tuvieron generación de nudos, en cambio TC3 y TC4 continuaron generando nudos.

Los tratamientos TC3 y TC4 presentaron el mayor número de hojas 5 y 4.5 respectivamente mientras que los tratamientos TC1 y TC2 generaron muy pocas hojas ver cuadro 3.1, en cuanto al desarrollo de raíz solamente lo presentaron los explantes del TC3 y TC4. Se observó la generación de callo el cual solamente lo presentaron TC1 y TC2, en general estos resultados muestran que el uso de un sistema cerrado tiene un efecto negativo en el desarrollo de la planta, una probable explicación es que podría existir la acumulación gases: CO<sub>2</sub>, etileno y vapor de agua en el sistema (Zobayed,2001). Se ha observado que en el caso de la propagación de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense*) la acumulación de etileno causa un efecto negativo, afectando el desarrollo de los procesos de morfogénesis (Santana *et al.*, 2006).

En el caso de plantas de agrillo en los sistemas cerrados se observa que el explante no presenta desarrollo (figura 3.1 A-H) y a partir del día 30 se empieza a desarrollar un callo color blanco a lo largo del tallo, el cual podría ser efecto del estrés causado por la acumulación de etileno que es una hormona vegetal que inhibe el crecimiento, la diferenciación y, en algunos casos promueve la senescencia de plantas, células y tejidos cultivados a concentraciones tan bajas como 0.01  $\mu\text{l l}^{-1}$  (Kozai, 1992). Por ejemplo, en el cultivo *in vitro* de brotes de *Ficus lyrata*, la acumulación de etileno fue acompañada por una disminución en el área de la hoja y un aumento en la formación de callo (Buddenford y Woltering,1994).

Cuadro 3.1 Efecto de intensidad de luz y aireación en el desarrollo de plantas de agrillo a los 30 y 60 días de cultivo *in vitro*

Tratamiento	30 días de cultivo				
	LE* [cm]	NN*	NH*	R [%]*	C
TC1	2.13±0.50 <sup>b</sup>	3.60±0.54 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	+
TC2	2.60±0.84 <sup>ab</sup>	3.80±0.83 <sup>ab</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	+
TC3	3.00±0.74 <sup>a</sup>	4.60±0.54 <sup>a</sup>	2.75±1.21 <sup>a</sup>	0.33±0.51 <sup>a</sup>	-
TC4	2.43±0.91 <sup>ab</sup>	4.40±0.54 <sup>ab</sup>	2.41±1.44 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	-
Tratamiento	60 días de cultivo				
	LE* [cm]	NN*	NH*	R [%]*	C
TC1	2.35±1.02 <sup>b</sup>	3.60±0.54 <sup>b</sup>	0.80±1.68 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	+
TC2	2.95±1.44 <sup>ab</sup>	3.80±0.83 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	+
TC3	4.28±1.01 <sup>a</sup>	5.40±1.14 <sup>a</sup>	5.00±1.05 <sup>a</sup>	0.80±0.44 <sup>a</sup>	-
TC4	3.36±2.12 <sup>ab</sup>	5.20±0.83 <sup>a</sup>	4.50±2.50 <sup>a</sup>	0.20±0.44 <sup>b</sup>	-

\*En el cuadro se representa la media con la desviación estándar, letras diferentes entre columnas denotan diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) para la prueba LSD.

En cuanto a la concentración de flujo de fotones fotosintéticos se puede observar que los tratamientos TC1 y TC4 con  $57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD presentaron una menor longitud del explante comparado con su contraparte TC2 y TC3 respectivamente (con  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD). Al comparar los tratamientos TC2 con TC1 y TC3 con TC4 se presenta una diferencia de 0.6 y 0.92 respectivamente en el día 60 de cultivo *in vitro*, esta diferencia puede estar causada por la diferencia de intensidad de luz. En plantas de agrillo en cultivo *in vitro* parece favorecer el desarrollo de la planta la concentración de flujo de fotones fotosintéticos de  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD, mientras que a concentraciones mayores ( $57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD) parece afectar el desarrollo de la planta *in vitro*, aunque en menor proporción comparada con el efecto de un sistema cerrado. En el caso del tratamiento TC4 se puede observar que a mayor intensidad de luz las hojas se empiezan a ver cloróticas (ver figura 3.1 O-P) comparada con el tratamiento TC3 (ver figura 3.1 K-L).

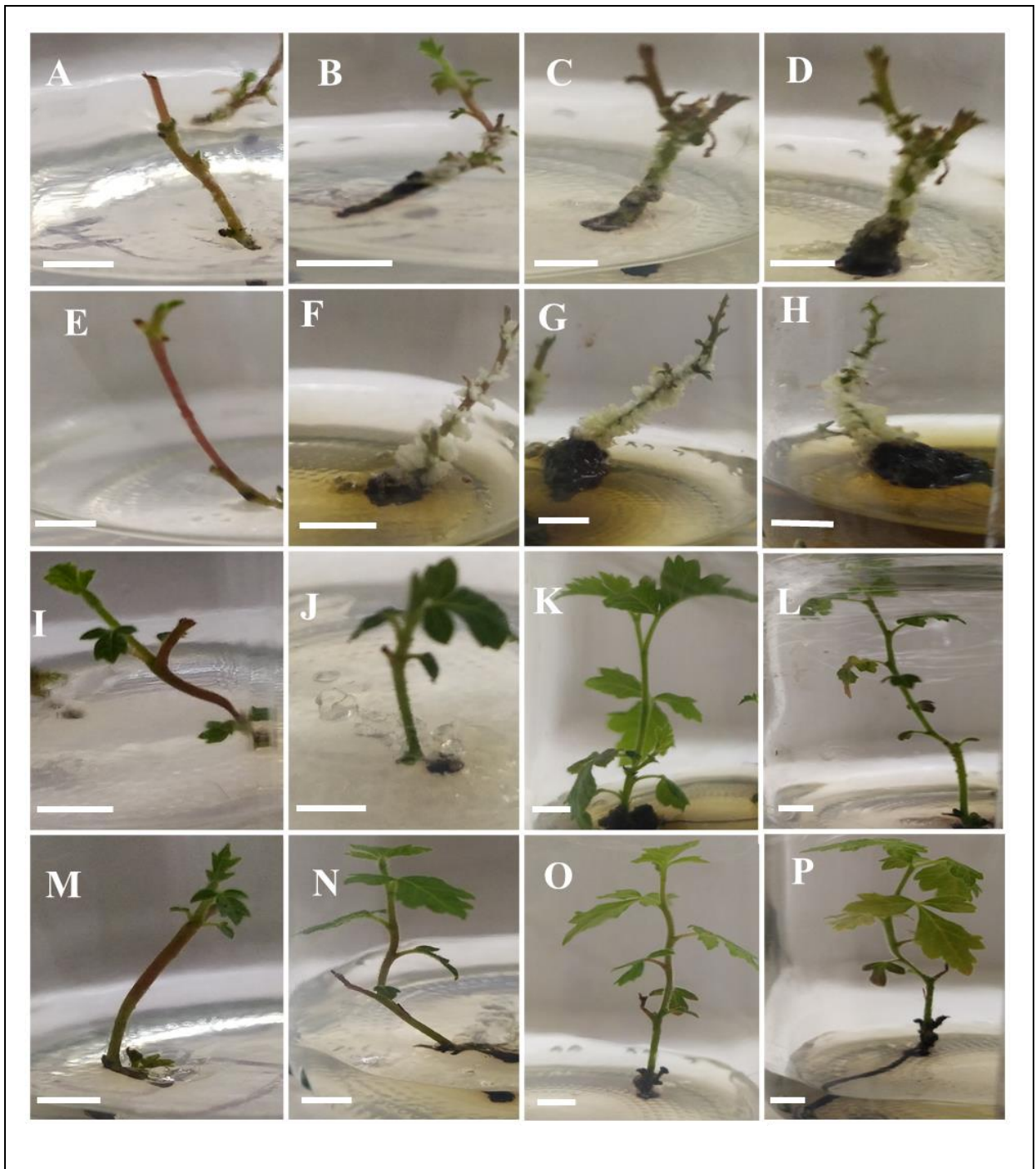


Figura 3.1 Desarrollo de plantas de agrillo en los diferentes sistemas de cultivo *in vitro* TC1. Cerrado a  $57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD (A-D); TC2. Cerrado a  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD (E-H); TC3. Semiabierto a  $57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD (I-L); TC4. Semiabierto a  $57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD (M-P). Día 15 (A, E, I, M), día 30 (B, F, J, N), día 45 (C, G, K, O) día 60 (D, H, L, P) Escala: 0.5 cm.



Lo anterior puede ser debido a que la intensidad de la luz y la fuente de luz son parámetros importantes que influyen en la regeneración del brote, el peso fresco y la biosíntesis de metabolitos secundarios durante la micropropagación de cultivos (Farhadi, 2017). Para el cultivo *in vitro* de agrillo a implementación de un sistema semiabierto (TC3 y TC4) incremento las diferentes variables del desarrollo como son longitud, número de hojas y formación de raíz comparado con los otros sistemas cerrados de cultivo *in vitro*, donde se generaron efectos adversos en el explante, como la formación de callo y fenolización (figura 3.1 A-H).

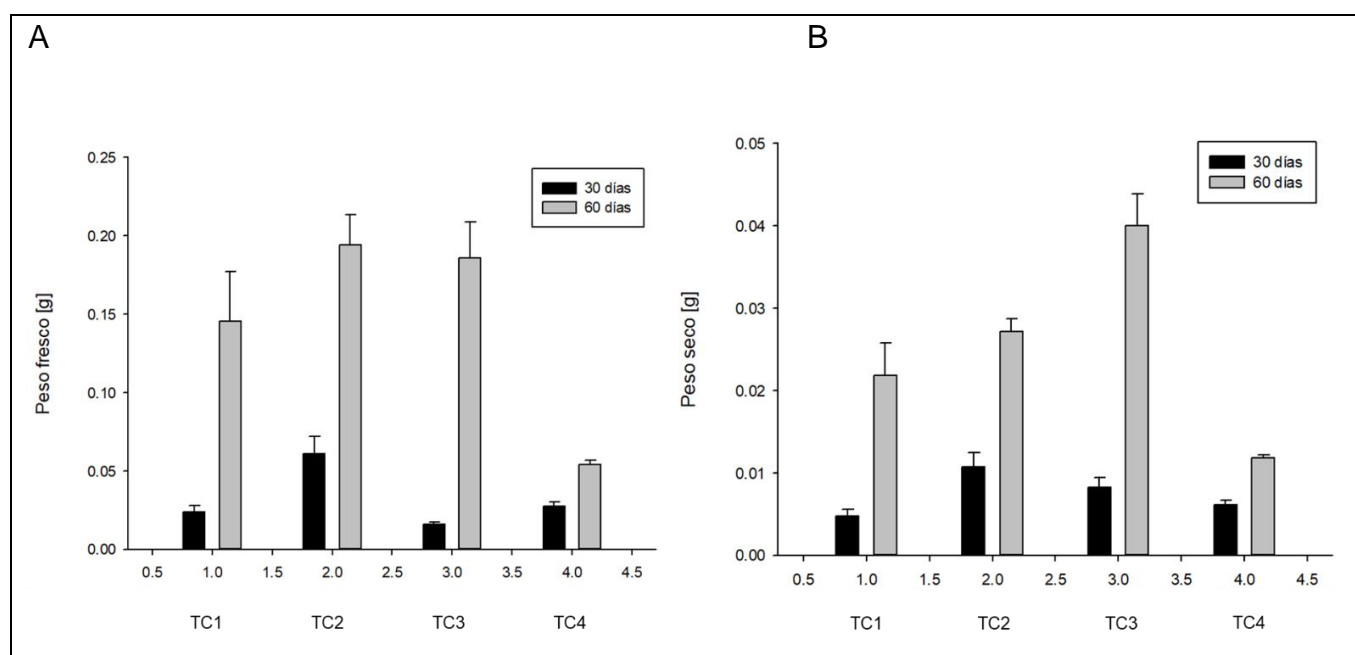


Figura 3.2 Peso fresco y peso seco a los 30 y 60 días de desarrollo de las plántulas *in vitro*

A) Peso fresco. B) Peso seco. Tratamientos: TC1. Cerrado a  $57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD; TC2. Cerrado a  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD; TC3. Semiabierto a  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD; TC4. Semiabierto a  $57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD.

Se determinó el peso fresco y peso seco en los diferentes tratamientos a los 30 y 60 días de cultivo. El tratamiento que presentó menor peso fresco en el día 30 de cultivo fue el TC3 con 0.015g, mientras que el TC2 presentó el mayor

peso fresco con 0.06g, sin embargo, a los 60 días de cultivo los tratamientos TC2 y TC3 incrementaron el peso fresco 3.16 y 12 veces respectivamente, (ver figura 3.2A), este parámetro refleja el contenido de agua presente en el tejido. En cuanto al peso seco a los 30 días de cultivo los tratamientos con menor peso fue el tratamiento TC1 y TC4 con 0.004 y 0.008g respectivamente, mientras que el tratamiento con mayor peso seco fue TC2 con 0.010g. Después de 60 días de cultivo el tratamiento TC3 presentó mayor peso seco con 0.04g, el tratamiento TC4 fue el que presentó menor peso seco con 0.011g, reflejando la mayor generación de tejido. Los sistemas evaluados presentaron diferencias en peso fresco y peso seco por explante, para el peso se tuvo una influencia principalmente en la formación de raíz y callo, las plantas que presentaban callo (TC2) aun con ausencia de hojas y raíces presentaban mayor peso fresco de hasta 0.2 g al día 60 a comparación de los tratamientos que tuvieron un desarrollo con ausencia de callo (ver figura 3.1).

### **3.1.5.2 Evaluación de reguladores de crecimiento en la multiplicación de plantas de agrillo en cultivo *in vitro*.**

Las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento tuvieron un efecto en el cultivo *in vitro* de agrillo, como se muestra en el cuadro 3.2. Se observó que la longitud del explante al día 30 fue mayor en los tratamientos TM1 y TM2 de 2.68 y 2.91 cm respectivamente, sin embargo, los tratamientos TM3 a T10 tuvieron un menor incremento de longitud por lo que no presentaron diferencia significativa entre ellos.

Al día 60 los tratamientos TM2, TM3 y TM5 fueron los que presentaron una mayor longitud en el explante y no presentaron diferencia significativa con TM1, el cual obtuvo una mayor longitud con 3.43 cm.

En cuanto al número de brote en el día 30 todos los tratamientos tuvieron generación de brotes, destacando TM1 a TM5 los cuales se desarrollaron en un medio con ausencia de auxinas y tuvieron un promedio de 2 brotes por explante.

Cuadro 3.2 Efecto de los reguladores de crecimiento en el desarrollo de las plantas de agrillo a los 30 y 60 días de cultivo *in vitro*

Tratamiento	30 días de cultivo			
	LE* [cm]	NB*	NH*	R [%]*
TM1	2.68±0.49 <sup>ab</sup>	2.00±0.89 <sup>ab</sup>	3.50±1.04 <sup>a</sup>	-
TM2	2.91±1.03 <sup>a</sup>	2.16±0.75 <sup>a</sup>	3.33±0.51 <sup>a</sup>	-
TM3	2.28±1.14 <sup>abc</sup>	2.00±0.63 <sup>ab</sup>	3.00±0.00 <sup>a</sup>	-
TM4	1.98±0.44 <sup>bc</sup>	2.00±0.89 <sup>ab</sup>	3.16±0.40 <sup>a</sup>	-
TM5	1.70±0.20 <sup>c</sup>	2.00±1.09 <sup>ab</sup>	3.00±0.00 <sup>a</sup>	-
TM6	1.70±0.42 <sup>c</sup>	1.50±0.83 <sup>ab</sup>	3.00±0.00 <sup>a</sup>	-
TM7	1.90±0.59 <sup>c</sup>	1.33±0.51 <sup>ab</sup>	3.00±0.00 <sup>a</sup>	-
TM8	1.95±0.70 <sup>bc</sup>	1.16±0.40 <sup>b</sup>	3.00±0.00 <sup>a</sup>	-
TM9	1.96±0.36 <sup>bc</sup>	1.33±0.81 <sup>ab</sup>	3.00±0.00 <sup>a</sup>	-
TM10	1.98±0.43 <sup>bc</sup>	1.33±0.81 <sup>ab</sup>	3.00±0.00 <sup>a</sup>	-
Tratamiento	60 días de cultivo			
	LE* [cm]	NB*	NH*	R [%]*
TM1	3.43±0.68 <sup>a</sup>	2.00±0.63 <sup>ab</sup>	5.33±1.03 <sup>a</sup>	-
TM2	2.91±0.43 <sup>ab</sup>	2.16±0.75 <sup>ab</sup>	4.66±1.21 <sup>ab</sup>	-
TM3	2.95±1.14 <sup>ab</sup>	2.83±1.94 <sup>a</sup>	3.50±0.54 <sup>bc</sup>	-
TM4	2.33±0.28 <sup>bc</sup>	2.00±1.09 <sup>ab</sup>	3.50±0.54 <sup>bc</sup>	-
TM5	2.80±0.44 <sup>abc</sup>	2.00±1.09 <sup>ab</sup>	5.33±1.50 <sup>a</sup>	-
TM6	1.96±0.48 <sup>c</sup>	1.50±0.83 <sup>b</sup>	3.33±0.81 <sup>bc</sup>	100
TM7	2.26±0.90 <sup>bc</sup>	1.33±0.51 <sup>b</sup>	3.16±1.72 <sup>c</sup>	-
TM8	2.01±0.83 <sup>c</sup>	1.50±0.83 <sup>b</sup>	3.50±1.87 <sup>bc</sup>	-
TM9	2.01±0.36 <sup>c</sup>	1.33±0.81 <sup>b</sup>	3.16±0.40 <sup>c</sup>	-
TM10	2.13±0.50 <sup>bc</sup>	1.33±0.81 <sup>b</sup>	3.66±1.03 <sup>bc</sup>	-

\*En el cuadro se representa la media con la desviación estándar, letras diferentes entre columnas denotan diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) para la prueba LSD.

Al día 60 a excepción del TM3. 1 mg L<sup>-1</sup> BAP los tratamientos no tuvieron desarrollo de brotes nuevos.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que la adición de citoquininas al medio de cultivo, en este caso BAP tuvo un efecto favorable para incrementar la brotación al igual que Safarnejad (2011) reporto en *Rhus coriaria* que el medio MS complementado con  $1 \text{ mgL}^{-1}$  BAP +  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  IAA fue el mejor medio para la propagación de brotes.

El número de hojas en el día 30 los tratamientos presentaron un promedio de 3 hojas. En el día 60 el número de hojas fue mayor en TM1, TM2 y TM5 con un promedio de 5.33, 4.66 y 5.33 hojas respectivamente y que se puede deber a la baja cantidad de reguladores de crecimiento que presentaba el medio.

En cuanto al TM3 (ver figura 3.3, I-L), destaco por la formación y características de los brotes, los cuales presentaron una coloración verde y crecimiento adecuado para las características deseadas.

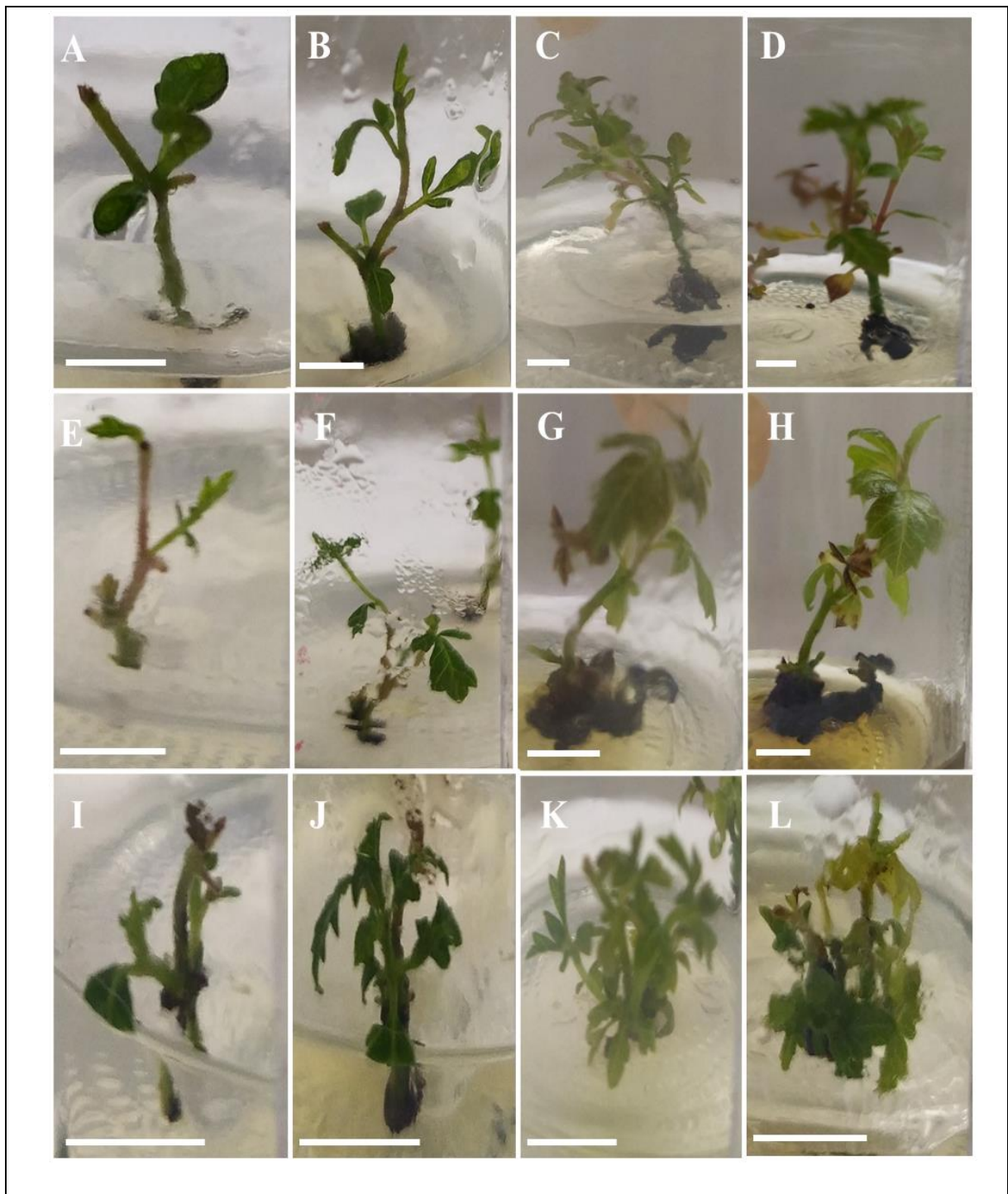


Figura 3.3 Efecto de BAP en el desarrollo de plántulas de agrillo, tratamientos (TM1 al TM3) TM1. Control (A-D); TM2. 0.5 mg L<sup>-1</sup> BAP (E-H); TM3. 1 mg L<sup>-1</sup> BAP (I-L). Día 15 (A, E, I, M), día 30 (B, F, J, N), día 45 (C, G, K, O) día 60 (D, H, L, P) Escala: 0.5 cm.

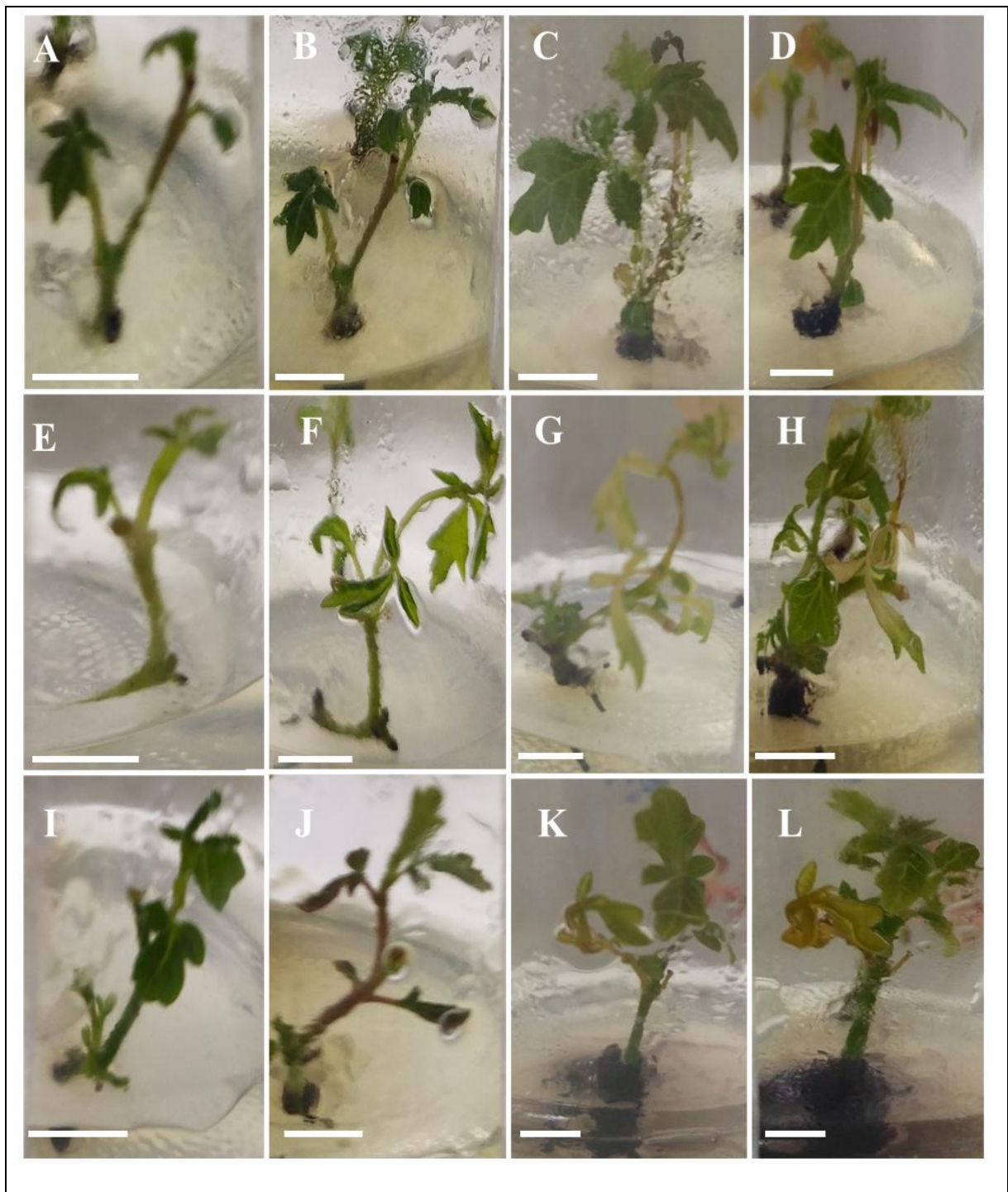


Figura 3.4 Efecto de BAP en el desarrollo de plántulas de agrillo, tratamientos (TM4 al TM6) TM4. 1.5 mg L<sup>-1</sup> BAP (A-D); TM5. 2.0 mg L<sup>-1</sup> BAP (E-H); TM6. 0.5 mg L<sup>-1</sup> AIB (I-L). Día 15 (A, E, I, M), día 30 (B, F, J, N), día 45 (C, G, K, O) día 60 (D, H, L, P) Escala: 0.5 cm.



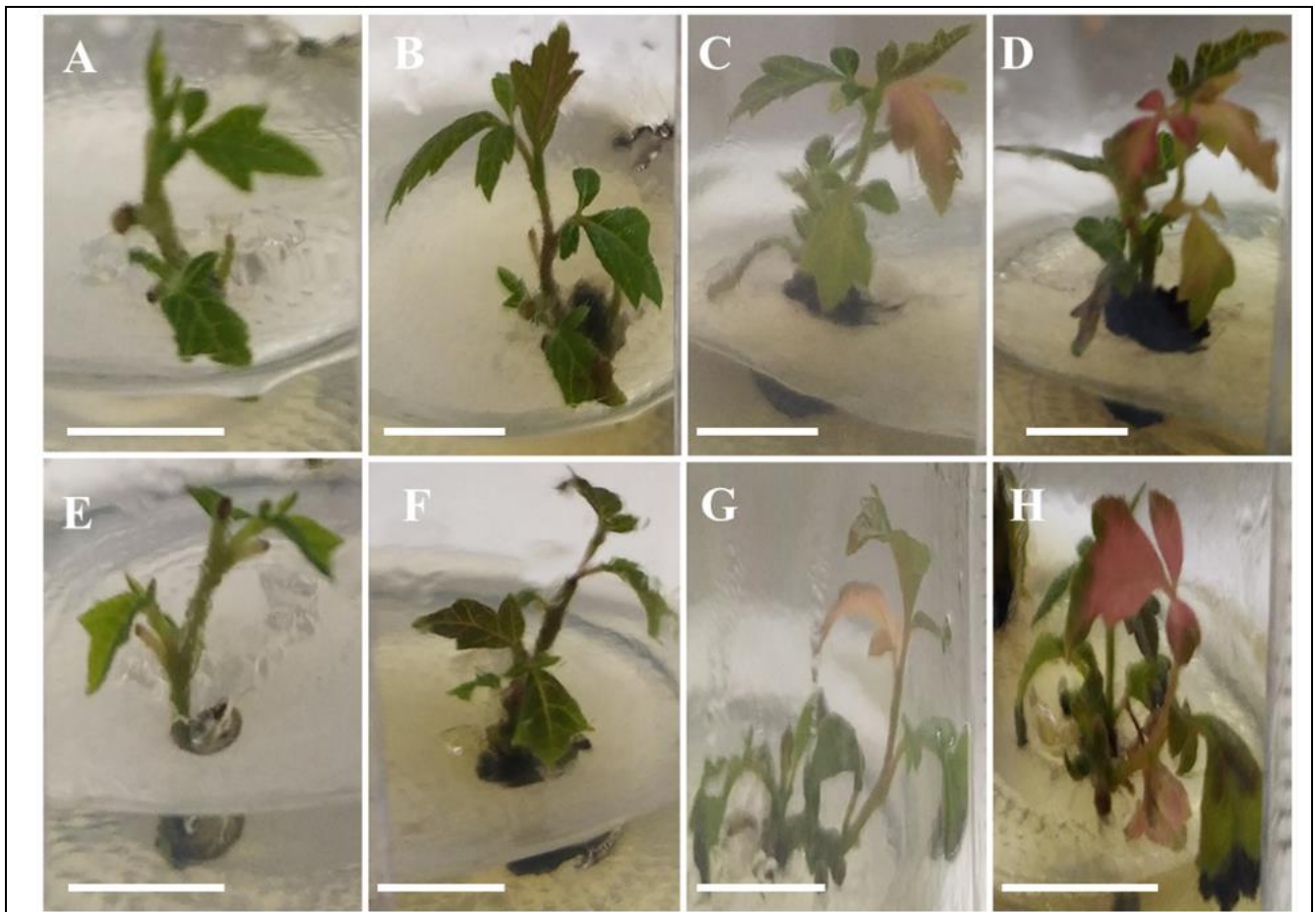


Figura 3.5 Efecto de BAP en el desarrollo de plántulas de agrillo, tratamientos (TM7 al TM8) TM7. 0.5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.5 mg L<sup>-1</sup> AIB (A-D); TM8. 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.5 mg L<sup>-1</sup> AIB (E-H). Día 15 (A, E), día 30 (B, F), día 45 (C, G) día 60 (D, H) Escala: 0.5 cm.

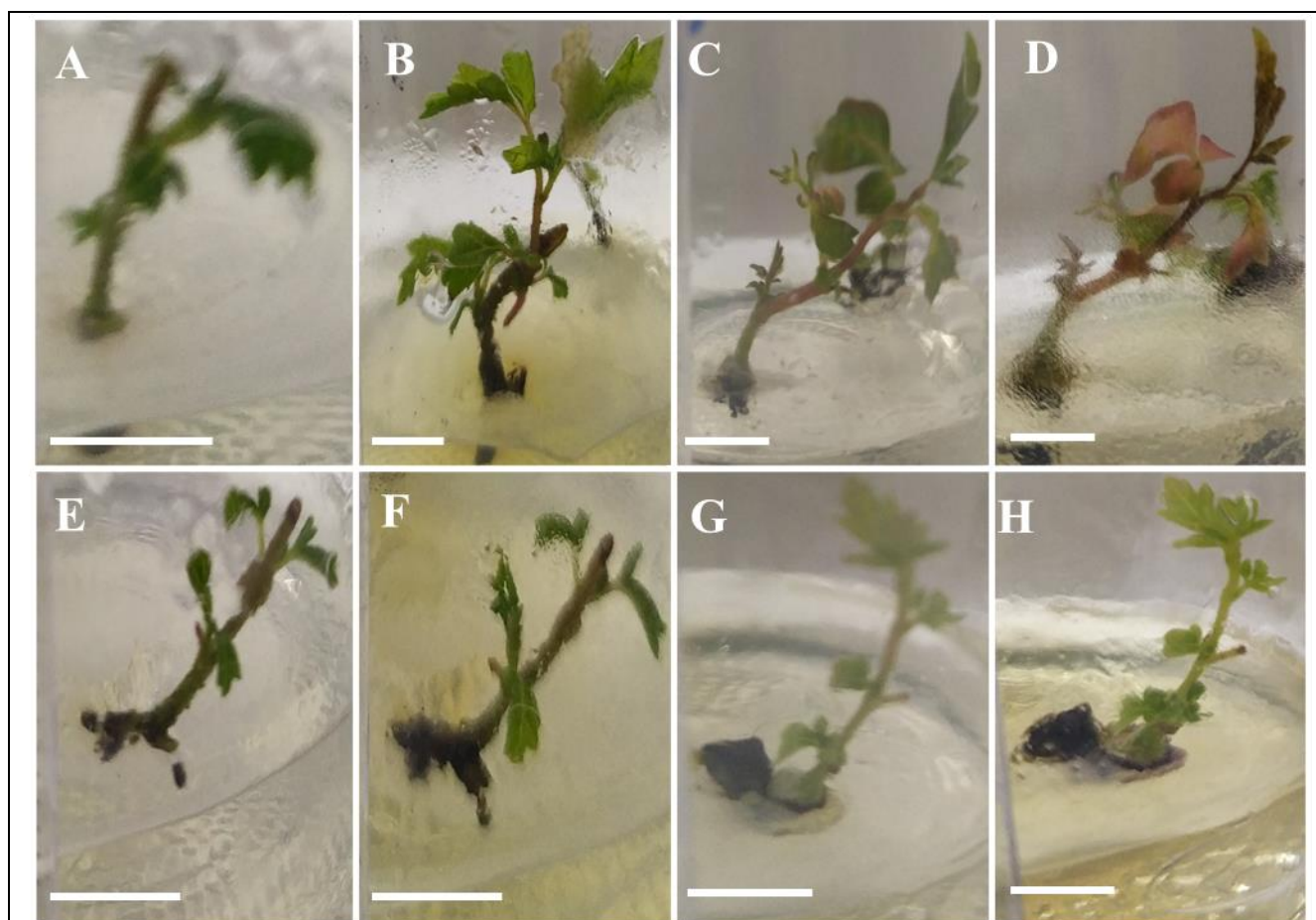


Figura 3.6 Efecto de BAP en el desarrollo de plántulas de agrillo, tratamientos (TM9 al TM10). TM9. 1.5 mgL<sup>-1</sup> BAP + 0.5 mgL<sup>-1</sup> AIB (A-D); TM10. 2 mgL<sup>-1</sup> BAP + 0.5 mgL<sup>-1</sup> AIB (E-H). Día 15 (A, E), día 30 (B, F), día 45 (C, G) día 60 (D, H) Escala: 0.5 cm.

Para el agrillo, se observaron alteraciones fenotípicas a partir del día 45 y con un subcultivo, se presentó un cambio de color en la hoja, defoliación y no se tuvo la formación de nuevos brotes (ver figura 3.4. D, H) Estas alteraciones se explican desde un punto de vista fisiológico; (Muhitch y Fletcher, 1985) mencionan que las células, al envejecer el cultivo, aumentan la probabilidad de sintetizar productos nocivos para el crecimiento vegetal, por lo cual la tasa de proliferación disminuye a medida que el número de subcultivos aumenta.



Se evaluó la generación de raíces, los tratamientos tuvieron generación de callo y solamente el TM6.  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  AIB, obtuvo la generación de raíz (ver fig. 3.7). Esto se debe a que la auxina no estimuló la proliferación de brotes, pero sí promueve el crecimiento de la raíz (Filipecki *et al*, 2005).

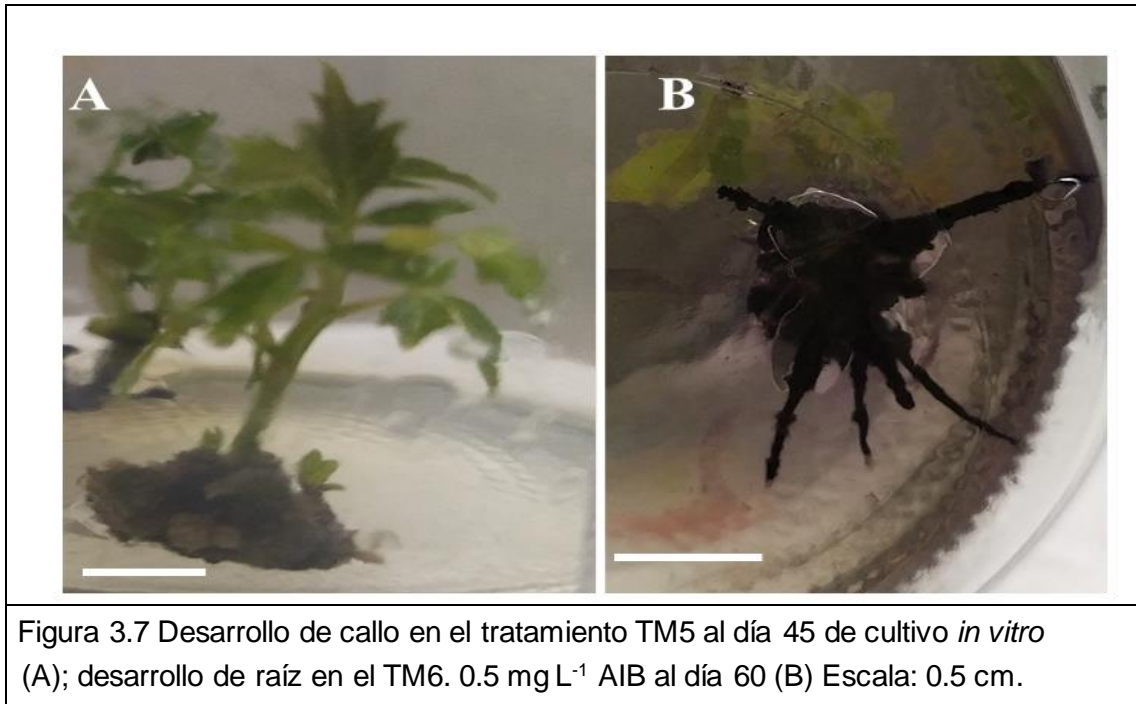


Figura 3.7 Desarrollo de callo en el tratamiento TM5 al día 45 de cultivo *in vitro* (A); desarrollo de raíz en el TM6.  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  AIB al día 60 (B) Escala: 0.5 cm.

### 3.1.5.3 Evaluación de enraizamiento *in vitro* de agrillo

En la etapa de multiplicación la formación de raíces se observó en muy pocos explantes, demostrándose que se requiere de una etapa para ser enraizada *in vitro*, el TM6. 0.5 mg L<sup>-1</sup> AIB fue el tratamiento que obtuvo la formación de raíz.

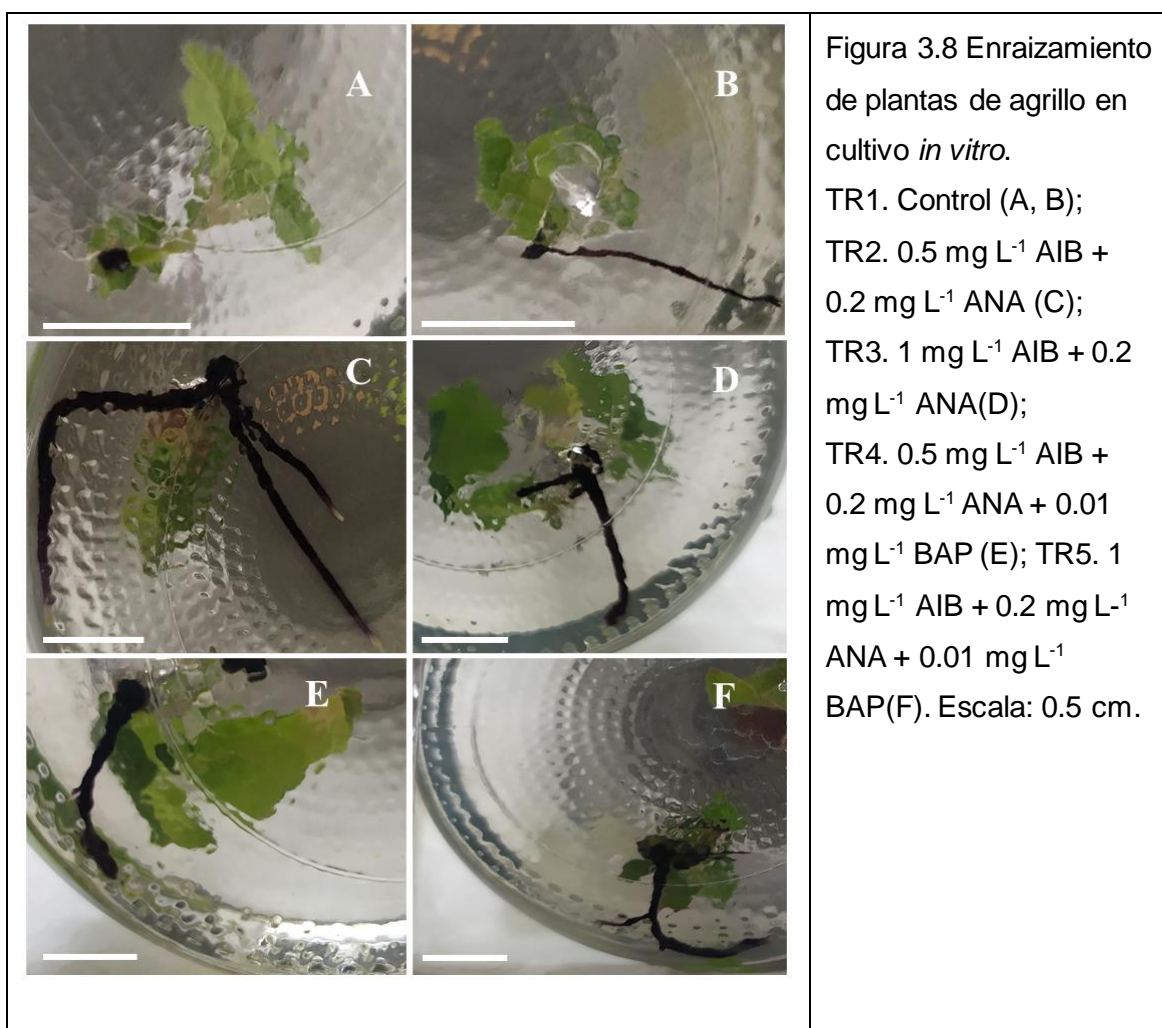
Por lo que se evaluó un protocolo de enraizamiento *in vitro* de la especie *Schinus molle* L. (Ayala, 2011) perteneciente a la misma familia. En el que utiliza el 50% de medio MS y la combinación de dos auxinas; (AIB, ANA) y una citoquinina (BAP) a diferentes concentraciones. Los resultados se evaluaron al día 30 y se muestra el desarrollo del explante, así como el porcentaje de generación y longitud de la raíz principal.

Cuadro 3.3 Efecto de los reguladores de crecimiento en el enraizamiento de plantas de agrillo a los 30 días de cultivo *in vitro*

Tratamiento	30 días de cultivo					
	LE*[cm]	NB*	NN*	NH*	LR*	R [%]*
TR1	3.13±0.61 <sup>a</sup>	0.50±0.53 <sup>a</sup>	3.62±0.74 <sup>b</sup>	4.25±0.88 <sup>b</sup>	0.53±0.96 <sup>a</sup>	37.5
TR2	3.72±0.87 <sup>a</sup>	0.40±0.51 <sup>a</sup>	4.80±1.31 <sup>a</sup>	5.33±1.16 <sup>a</sup>	1.34±1.01 <sup>a</sup>	70
TR3	3.14±0.98 <sup>a</sup>	0.30±0.48 <sup>a</sup>	5.10±1.28 <sup>a</sup>	5.33±1.05 <sup>a</sup>	0.87±0.69 <sup>a</sup>	70
TR4	3.39±1.14 <sup>a</sup>	0.30±0.48 <sup>a</sup>	5.10±1.28 <sup>a</sup>	5.30±1.05 <sup>a</sup>	0.89±0.69 <sup>a</sup>	70
TR5	2.87±1.12 <sup>a</sup>	0.60±0.69 <sup>a</sup>	4.80±1.03 <sup>a</sup>	5.00±1.15 <sup>ab</sup>	0.70±0.91 <sup>a</sup>	50

\*En el cuadro se representa la media con la desviación estándar, letras diferentes entre columnas denotan diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) para la prueba LSD.

Los resultados presentados (ver cuadro 3.3), permiten afirmar que un medio de cultivo reducido en sales, así como la adición de auxinas promueve el desarrollo de raíces. Se observó que la longitud de raíz en el día 30 para los tratamientos fue mayor en el TR2 con un promedio de 1.34 cm, logrando además la formación de raíces secundarias (fig. 3.8 C), sin embargo, no hubo diferencia significativa entre ellos. Para el porcentaje de enraizamiento hubo un incremento con respecto al control TR1 entre los tratamientos presentando un 70% de generación de raíces. El uso de auxinas para la generación de raíz ha sido reportado en *Rhus coraria* el cual presentó un porcentaje de enraizamiento de 60% utilizando el medio MS + 1 mg L<sup>-1</sup> AIB y en *Schinus molle* L. especie perteneciente a la familia del género *Rhus*, logro generar enraizamiento utilizando el medio MS al 50% de su concentración al 0.5 mg L<sup>-1</sup> AIB + 0.2 mg L<sup>-1</sup> ANA. (Ayala, 2011; Safarnejad, 2011).



### 3.1.6 Conclusiones

El uso de un sistema semiabierto permite el desarrollo normal de plantas de agrillo a comparación de los sistemas cerrados donde se genera la formación de callo. La variación de flujo de fotones fotosintético entre 57 a 37  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD no afecta el desarrollo de la planta *in vitro*. De manera general, el sistema T3. semiabierto a 32  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD, nos permitirá evaluar el efecto de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento en la inducción de brotes y raíz.

La adición de reguladores de crecimiento tiene un efecto positivo en la generación de brote y raíz en el cultivo *in vitro* de agrillo, La adición de BAP 1  $\text{mg L}^{-1}$  presento una mejor respuesta en cuanto a la generación de brotes, característica que es requerida para la micropropagación. La generación de raíz se logró solamente con adición de auxina: AIB a 0.5  $\text{mg L}^{-1}$ .

Una combinación de reguladores de crecimiento BAP y AIB al medio semisólido no resulto favorable para el desarrollo de brote y raíz en una sola etapa, por lo que se sugiere separar en dos etapas: multiplicación *in vitro* y enraizamiento.

Para la etapa de enraizamiento de agrillo en condiciones *in vitro* la disminución del medio MS a la mitad de su concentración, así como la adición de auxinas, promueven la generación de raíces.

### 3.1.7 Bibliografía

Ameena Abdullah H., Al Maliki S., and Suliman K. M. (2009). Effect of medium strength and charcoal combined with IBA and NAA on root initiation of *Ficus Anastasia*.

Ayala, A. N. (2011). Establecimiento de cultivo *in vitro* de molle (*schinus molle* l.) a partir de yemas axilares tomadas de plantas madre como una herramienta para la propagación de la especie en el distrito metropolitano de quito. Escuela politécnica del ejército. 125-127.

Benson, EE (2000) Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36: 163-170

Bisht, T. S., Rawat, L., Chakraborty, B., & Yadav, V. (2018). A recent advance in use of plant growth regulators (pgrs) in fruit crops - a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7 (5), 1307-1336.

Borschevsky M. O. & Kitaev O. I. (2013). Frost resistance of *Rhus typhina* L. in habitats with different levels of anthropogenic transformation. – *Scientific Bulletin of Ukrainian National Forestry University* 23.16: 69–73.

Buddenford-Joosten, JMC y Woltering EJ .(1994). Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. *Plant Growth Reg.* 15:1-16

Dixon, R.A and Gonzales, R.A. (1995). *Plant Cell Culture: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford. UK. p. 37-42.

Farhadi N, Panahandeh J, Azar AM, Salte SA. (2017). Effects of explant type, growth regulators and light intensity on callus induction and plant regeneration in four ecotypes of Persian shallot *Sci Hortic* 218:80–86.

Filipecki, M., Wisniewska, A., Yin, Z. and Malepszy, S. (2005). The heritable changes in metabolic profiles of plants regenerated in different types of *in vitro* culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 82:349–356.

Flores García, Andrés, & Álvarez Moctezuma, José Guadalupe, & Rodríguez de la O, José Luis, & Corona Ambris, Alejandro. (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl.. *Foresta Veracruzana*, 10(2),27-33.

George, E.F. (2000). *Plant Propagation by tissue culture. Handbook and Directory of commercial laboratories*. Exegeties L.td. Eversely, Basingstoke,England.

George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, J. D. (2008). Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors. In: E. F. George, M. A. Hall & G.J. Klerk Ed.), *Plant propagation by tissue culture*. (pp. 175–204).

Hall, R.D. (ed.) (1999). *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press, Ottawa.

- Hartmann HT, Kester DE. (1992). Propagación de plantas. Principios y prácticas. Trad. A. M. Ambrosio. Sexta reimpresión. Compañía Editorial Continental, S. A. De C. V. México. 760 pp.
- Hermann, E.B. (1991-2006) Recent Advances in Plant Tissue Culture.
- Jaafar, H. Z., Black, C.R., Atherton, J.G. and Roberts J.A. (1999). Impact of water stress on reproductive development in sweet pepper (*Capsicum annum* L) IV. Inhibition of CEPA induced ethylene.
- Koning, Ross E. (1994). Cell Cycle. Plant Physiology Information Website. [http://plantphys.info/plant\\_physiology/cellcycle.shtml](http://plantphys.info/plant_physiology/cellcycle.shtml). (6-2-2020).
- Kozai, T, Fujiwara M, Hayashi M y Aitken-Christie J. (1992). The *in vitro* environment and its control in micropropagation. En: Kurata, K. y Kozai. Transplant Production Systems, pp. 247-282.
- Kumar, P. P., Lakshmanan, P. and Thorpe, T. A. (1998). Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 34: 94-103.
- Marín, J.A. (1993). Micropropagación de especies frutales. *Horto Frutic.* 1: 56-62
- Murashige, t.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Razdan, M.K. (2005). Ph.D.,FSCG. Introduction to Plant Tissue Culture.2nd edition Science Publishers,Inc. Enfield (NH),USA.
- Safarnejad Abbas, Saycdch Bi Bi .Layla Alamdari. (2011). Tissue culture in medicinal plant of sumac (*rhus coriaria*). *International Journal of Science and Nature*, I.J.S.N. ,VOL. 2(4) 2011: 760-763.
- Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Iglesias-Andreu L. G., Montalvo-Peniche M.C. López-Puc G. y Barahona Pérez F. (2006). Improvement of *In Vitro* Culturing of Habanero Pepper by Inhibition of Ethylene Effects. *HORTSCIENCE* 41 (2) 405-409.
- Skoog F & CO Miller. (1965). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In: *Molecular and Cellular Aspects of Development.*, E. Bell ed., Harper and Row, New York, pp. 481-494.
- Su, Y. H., Liu, Y. B., & Zhang, X. S. (2011). Auxin – cytokinin interaction regulates meristem development.
- Uranbey, S. (2004). Comparison of Kinetin and 6-benzyladenine (BA) on in vitro Microtuberization of Potato Under Short Days Conditions. Centenary University, Faculty of Agriculture, *Journal of Agricultural Sciences (J. Agric. Sci.)*, 15(1): 39-41
- Vidalie H. (1986). Cultivo *in vitro*. Ed. Científica, S.A de C.V. México, D.F. pp:1–138.
- Zobayed, S. M. A. (n.d.). (2001). Aeration In Plant Tissue Culture. Focus on Biotechnology. 313–327.

## 4. CAPÍTULO 4.

### 4.1 Propagación de plantas de agrillo (*Rhus allophylloides*) por medio de biorreactores

#### 4.1.1 Resumen

Actualmente no se tiene un cultivo comercial de agrillo, para establecerlo es necesario generar estrategias de propagación de la planta encontrando una alternativa en el cultivo *in vitro*. A comparación de un medio semisólido, el uso de un sistema de inmersión temporal (SIT) resulta en mayores tasas de crecimiento además que permite la automatización del proceso. Se evaluaron tres diferentes tiempos de inmersión (10, 20 y 30 minutos) con una frecuencia de inmersión de 6 horas en frascos de vidrio con capacidad de un litro, cada biorreactor contenía 200 mL de medio de cultivo con 10 explantes por unidad. Se utilizó el medio de cultivo MS de multiplicación suplementado con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. Los resultados obtenidos permitieron establecer que el tiempo óptimo de inmersión fue de 20 minutos con una frecuencia de 6 horas presentando un mejor desarrollo y generación de brotes de plantas de agrillo a los 30 días de cultivo.

**Palabras clave:** *Rhus allophylloides*, Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), tiempos de inmersión

#### 4.1.2 Introducción

El cultivo de tejidos consiste en tomar pequeñas secciones del tejido de una planta o estructuras enteras (explantes) y cultivarlas en medios compuestos de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y reguladores de crecimiento para la regeneración de plantas. Sin embargo, en los protocolos de micropropagación en medio semisólido, la fase de multiplicación incluye numerosos subcultivos que consumen la mayor cantidad de tiempo y recursos en el laboratorio. El uso de medios líquidos en procesos de micropropagación se

considera la solución ideal para reducir los costos de producción de plántulas y permitir la automatización (Preil, 2005; Ziv, 2005).

Dentro de las ventajas que proporcionan el uso de medios líquidos son: condiciones de cultivo uniformes, el medio puede ser renovado fácilmente sin necesidad de cambiar de recipiente, la limpieza del recipiente luego de un periodo de cultivo es más fácil y se reducen los subcultivos (Adelberg, 2004). Su uso a menudo resulta en mayores tasas de crecimiento en relación con el medio semisólido.

Un biorreactor es un sistema de cultivo usualmente automatizado cuya principal función es proveer al cultivo de un ambiente controlado para lograr las condiciones óptimas para el crecimiento celular y para la producción de subproductos de interés comercial provenientes del cultivo.

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) son sistemas de cultivo periódicos semiautomatizados o totalmente automatizados, basados en ciclos alternados de inmersión temporal del tejido vegetal cultivado en el medio líquido, seguido de drenaje y exposición del tejido de la planta a un entorno gaseoso. En la actualidad existen sistemas de inmersión temporal comerciales: RITA® y MATIS® (CIRAD, Francia), SETIS™ (Vervit, Bélgica), PLANTIMA (A-Tech), BIOMINT® (CICY, México), MicroRoker (We Vitro, Canadá) y algunos diseños no comerciales: (Berthouly y Etienne, 2005); (Hernández-Soto *et al.*, 2008; Georgiev *et al.*, 2014; Morales *et al.*, 2014; Welander *et al.*, 2014; Bello *et al.*, 2019; Martínez Estrada *et al.*, 2019).

Los SIT aportan una serie de características que son benéficas: en comparación con otros tipos de biorreactores al evitar la inmersión continua del material vegetal en el medio de cultivo, este tipo de sistemas proveen una adecuada transferencia de oxígeno, facilitan los cambios secuenciales y automatizados del medio de cultivo, reducen la contaminación microbiana y tienen un costo menor a la de otros reactores convencionales. (Etienne y Berthouly, 2002).



El éxito con los SIT se logra con establecer los tiempos de inmersión y la frecuencia requerida para cada especie. El contacto intermitente del medio nutritivo con los explantes proporciona una capa delgada de medio que se adhiere en toda la superficie del explante por cohesión y se renueva con cada inmersión. además dichos parámetros se encuentran relacionados tanto en la asimilación de los nutrientes por los explantes, como en la renovación de la atmósfera dentro del recipiente de cultivo evitando la acumulación de gases perjudiciales como el etileno, que promueve la senescencia de los tejidos, así se facilita la regulación de la concentración de CO<sub>2</sub> y se mejora la oxigenación de los tejidos, ajustando los tiempos y frecuencias inmersión se puede eliminar o controlar la hiperhidricidad, que afecta gravemente a los cultivos en medio líquido (Ashraf *et al.* 2013).

En general, el periodo de inmersión es corto, de unos minutos, mientras que el período de exposición al aire se prolonga por varias horas. El ajuste preciso de la duración de los períodos de inmersión y exposición puede reducir significativamente la asfixia del tejido vegetal al crear las condiciones para un suministro óptimo de humedad y nutrientes con un mínimo contacto con el líquido. Por lo tanto, un sistema automatizado SIT para la multiplicación masiva de plantas, ofrece nuevas formas de lograr altos rendimientos de plántulas *in vitro*, a bajo costo, adecuadas para la investigación y las actividades comerciales (Etienne y Berthouly, 2002; Paek *et al.* 2001; 2005), ejemplo de ello, son cultivos como gladiolo *Gladiolus spp* y Vainilla *Vanilla planifolia Jacks. ex Andrews que*, comparado con el medio semisólido, el uso de biorreactores (SIT) presentan una mayor eficiencia de multiplicación de brotes (Chávez *et al.* 2018; Jericó *et al.* 2014).

En la presente investigación se utilizó un SIT automatizado, con el objetivo de determinar los tiempos de inmersión temporal óptimos para la propagación *in vitro* de Agrillo.

### **4.1.3 Metodología**

#### **4.1.3.1 Material vegetal.**

Se colectaron frutos en la región de Arandas, Jalisco, México. El fruto de agrillo fue despulpado para obtener la semilla, los cuales se lavaron con detergente comercial y se sometieron a un proceso modificado de desinfección en condiciones asépticas (Flores *et al.*, 2008). Las semillas se colocaron en una solución de fungicida; benomilo  $1\text{ g L}^{-1}$  por 20 minutos, se efectuaron dos lavados con agua estéril, posteriormente se realizó una inmersión en cloro comercial al 30% por 30 min, dos lavados con agua estéril alcohol al 70° durante 3 minutos y finalmente se realizaron dos lavados con agua estéril.

#### **4.1.3.2 Experimento de la evaluación de tiempos de inmersión en la propagación de plantas de agrillo.**

Se realizó la germinación *in vitro* de semillas de agrillo, después de 30 días se obtuvieron plántulas *in vitro* para realizar la evaluación se tomaron explantes de aproximadamente 3 cm y con el desarrollo del primer par de hojas verdaderas (figura 4.1). Los explantes y el medio se colocaron en frascos de vidrio con capacidad de 1L, se adicionaron 200 mL de medio líquido MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con sacarosa 3% (p/v) y polivinilpirrolidona (PVP)  $1\text{ g L}^{-1}$  y  $1\text{ mg L}^{-1}$  de BAP, se ajustó el medio de cultivo a un pH de 5.8 y se esterilizaron durante 20 min en una autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 1.5 atmósferas de presión.

Se establecieron diferentes tiempos de inmersión con una frecuencia cada 6 horas (4 inmersiones al día) para cada tratamiento (TB) como se indica a continuación: TB1. Control (medio semisólido), TB2. 10 min de inmersión, TB3. 20 min de inmersión, TB4. 30 min de inmersión. Se realizó la evaluación a los 30 días de cultivo de los siguientes parámetros de desarrollo: Longitud del explante (LE), Numero de brotes (NB), número de hojas (NH), Longitud de Raíz (LR), presencia o ausencia de raíz (+/-).

#### **4.1.3.3 Aclimatación *ex vitro*.**

Para la aclimatación se utilizó sustrato de germinación al 100%, las plántulas se extrajeron de los frascos y fueron sumergidas en una solución de benomilo 2 g L<sup>-1</sup>, se añadió RADIX® 10,000 a la raíz y se sembraron en un contenedor con una cubierta plástica (figura 4.3). Durante 15 días se retiró paulatinamente la cubierta permitiendo la adaptación a las condiciones externas.

#### **4.1.4 Diseño experimental y análisis de datos**

##### **4.1.4.1 Evaluación de tiempos de inmersión.**

Se empleó un diseño experimental completamente al azar, los datos presentados corresponden a 3 repeticiones por tratamiento con 10 explantes por repetición. Los datos obtenidos durante el experimento se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias se determinó por la prueba de LSD ( $P < 0.05$ ), ver cuadro 4.1.

##### **4.1.4.2 Aclimatación *ex vitro*.**

Se determinó el porcentaje de supervivencia en la aclimatación de los tratamientos TB1 y TB3 previamente descritos. Se tomó una muestra de 12 explantes por tratamiento para obtener el porcentaje de aclimatación, ver cuadro 4.2.

#### 4.1.5 Resultados

El establecimiento en biorreactores se realizó a partir de explantes generados de la germinación de semillas en medio semisólido durante 30 días, cuando presentaron las primeras hojas verdaderas con una altura aproximada de 3 cm (figura 4.1A). En el tratamiento TB1 se mantuvieron en el medio semisólido (figura 4.1B)., mientras que en TB2 a TB4 se utilizó el SIT donde se transfirieron a medio líquido (figura 4.1C).

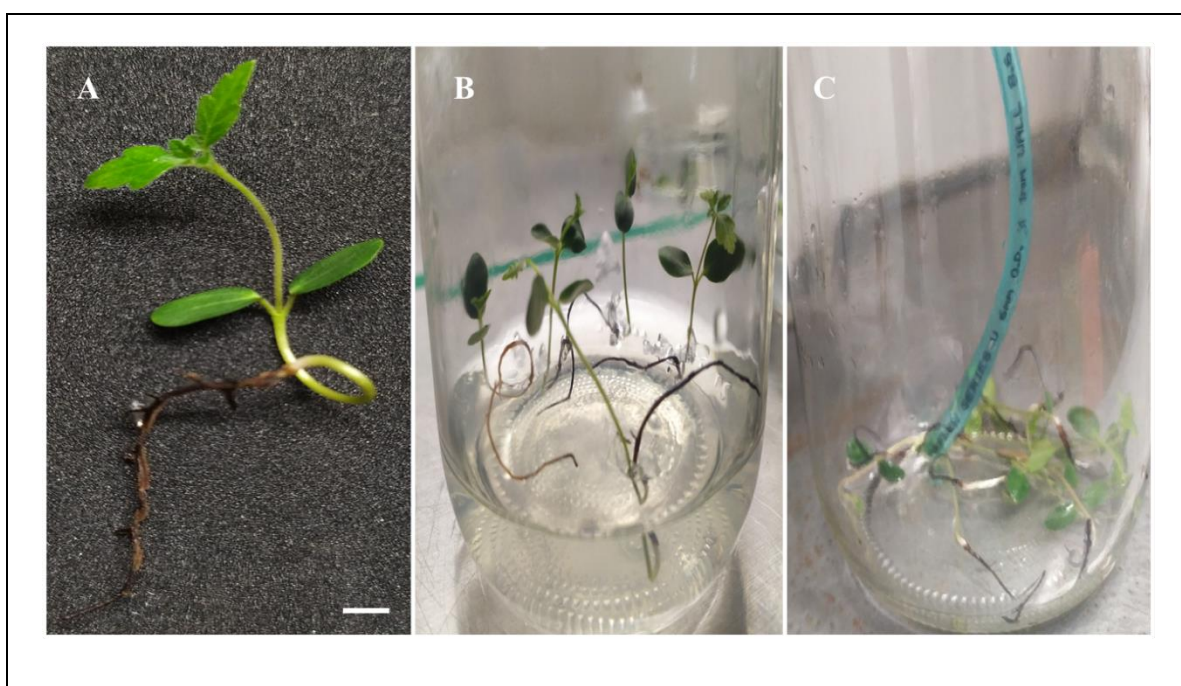


Figura 4.1 Establecimiento de los tratamientos en el día cero del cultivo *in vitro*  
A) Explante inicial; B) TB1. medio semisólido; C) TB2. Sistema de inmersión temporal.  
Escala de la barra: 0.5 cm.

##### 4.1.5.1 Evaluación de tiempos de inmersión

El tiempo de inmersión en el sistema de inmersión temporal influyó de forma significativa. Con un tiempo de inmersión de 20 minutos y una frecuencia de 6 horas, se alcanzaron los mejores resultados para las variables evaluadas: longitud de explante (9,33), número de brotes (3,30), número de nudos (7,30),

número de hojas (9.30) con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos.

Cuadro 4.1. Evaluación de los tiempos de inmersión para el desarrollo de plantas de agrillo a los 30 días de cultivo *in vitro*.

Tratamiento	30 días de cultivo					
	LE* [cm]	NB*	NN*	NH*	R*	LR*
TB1	4.60±1.17 <sup>c</sup>	1.30±0.65 <sup>b</sup>	3.40±0.93 <sup>b</sup>	4.50±1.22 <sup>bc</sup>	+	2.86±1.12 <sup>a</sup>
TB2	7.05±0.74 <sup>b</sup>	0.93±0.74 <sup>b</sup>	4.20±0.66 <sup>b</sup>	5.13±0.77 <sup>b</sup>	+	2.73±0.29 <sup>ab</sup>
TB3	9.33±1.40 <sup>a</sup>	3.30±2.03 <sup>a</sup>	7.30±3.05 <sup>a</sup>	9.30±3.55 <sup>a</sup>	+	2.50±1.04 <sup>ab</sup>
TB4	7.35±1.15 <sup>b</sup>	1.06±0.69 <sup>b</sup>	3.60±0.49 <sup>bc</sup>	3.66±0.47 <sup>c</sup>	+	2.41±0.42 <sup>b</sup>

\*En el cuadro se representa la media con la desviación estándar, letras diferentes entre columnas denotan diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) según prueba de LSD.

Los resultados en los tratamientos donde se utilizó un sistema de inmersión temporal TB2, TB3 y TB4 presentaron una mayor longitud del explante comparado con el control en el medio semisólido (TB1). En cuanto al número de brote, número de nudos y número de hojas el TB2 y TB4 presenta valores bajos y no presenta diferencia significativa con el control (TB1), mientras que el tratamiento TB3 presenta los valores más altos en el número de brotes, número de nudos y número de hojas con 3.3, 7.3 y 9.3 respectivamente presentando diferencias significativas comparado con los demás tratamientos.

Se observó un rápido desarrollo dentro del sistema de inmersión temporal, sin embargo, para TB2 se tuvieron problemas de contaminación dentro del medio a los 15 días del establecimiento, afectando el desarrollo (figura 4.2B), (Steingroewer *et al.*, 2013). En el caso de TB4 una inmersión de 30min cada 6hrs en plantas de agrillo se presentaron problemas de hiperhidricidad (figura 4.2D), se puede observar que presenta un color verde amarillento y genera poco número de nudos, ver cuadro 4.1. Martre y colaboradores (2001) describieron que prolongados períodos de inmersión afectan el desarrollo del material vegetal, causado por un incremento de la hiperhidricidad y el estrés oxidativo.

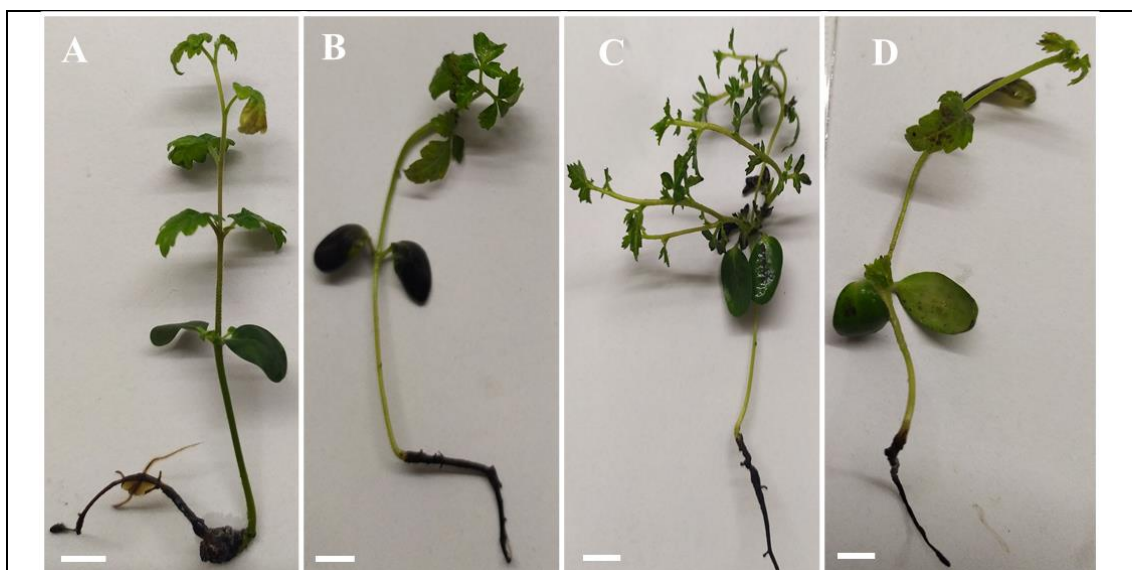


Figura 4.2 Desarrollo de plantas de agrillo a los 30 días de cultivo en SIT A). TB1. Control (medio semisólido); B) TB2 en SIT con 10 min de inmersión; C) TB3 en SIT con 20 min de inmersión; D) TB4 en SIT con 30 min de inmersión. Escala de la barra: 0.5 cm. Biorreactor - SIT (Sistema de inmersión temporal)

Dentro de las ventajas del uso de un sistema de inmersión temporal encontramos que se genera un intercambio gaseoso el cual proporciona una mejor asimilación de los nutrientes, adicionalmente, se da una mejor difusión de sustancias y disminución de la humedad relativa, aspectos que reducen la condición de estrés (Castro y González, 2001), en el caso del agrillo se pudo observar que en un sistema de inmersión temporal el desarrollo de la longitud del explante es 2 veces mayor en comparación a un medio semisólido.

Escalona y colaboradores (2006) mencionan que es necesario determinar el tiempo y la frecuencia de inmersión según la fase de cultivo para satisfacer los requerimientos del material vegetal. Se determinó que dentro de los tiempos de inmersión evaluados: 20 min cada 6hrs (ver figura 4.2C), obtuvo la mejor respuesta y por lo tanto una mayor eficiencia en la asimilación de nutrientes por los explantes. Basail y colaboradores (2013) reportaron en banano que un tiempo de inmersión de 10 min cada 3 hrs generaba un incremento en la tasa de multiplicación.

#### 4.1.5.2 Aclimatación ex vitro

La aclimatación del material vegetal es una etapa fundamental en un sistema de micropropagación porque de esto depende la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas producidas *in vitro* (Agramonte *et al.*, 1998).

Los tratamientos TB2 y TB4 no fueron evaluados debido a que los explantes presentaban contaminación, hiperhidricidad y no lograron llegar al establecimiento *ex vitro*. Por lo tanto, se realizó el establecimiento de las plántulas provenientes de los tratamientos TB1 y TB3 en condiciones *ex vitro* (figura 4.3), donde se evaluó la supervivencia de las plántulas y el porcentaje de aclimatación que presentaron, los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 4.2.

Cuadro 4.2 Porcentaje de aclimatación ex vitro de plantas de agrillo en sustrato a los 15 días

Tratamiento	Supervivencia	% Aclimatación
TB1	11/12	91.6
TB3	3/12	25

El proceso de aclimatación se fue ajustando a partir de observaciones, de acuerdo con los protocolos de aclimatación, con la finalidad de obtener un alto porcentaje de supervivencia, una aclimatación por encima del 80% es considerada como aceptable. Rohr *et al.* (2003) indican que el mayor problema de supervivencia es la carencia de vigor de la planta y la necrosis de la plántula se debe a la excesiva pérdida de humedad por efecto de la temperatura durante la transferencia de plantas micropropagadas en condiciones *in vitro* (alta humedad relativa; HR) a condiciones ambientales con bajos niveles de HR. Debnath (2005) indica que para alcanzar una tasa de supervivencia y rápida aclimatación en condiciones de invernadero se debe mantener la humedad relativa de 90-95%.

Durante las etapas iniciales del trasplante, el principal cambio que se realiza en las condiciones de crecimiento de la planta es su transferencia de un medio rico en nutrientes orgánicos a un sustrato que proporciona únicamente nutrientes inorgánicos. En estas condiciones, solo sobrevivirían las plantas que pueden formar una maquinaria fotosintética funcional para mantener un modo autótrofo de nutrición.

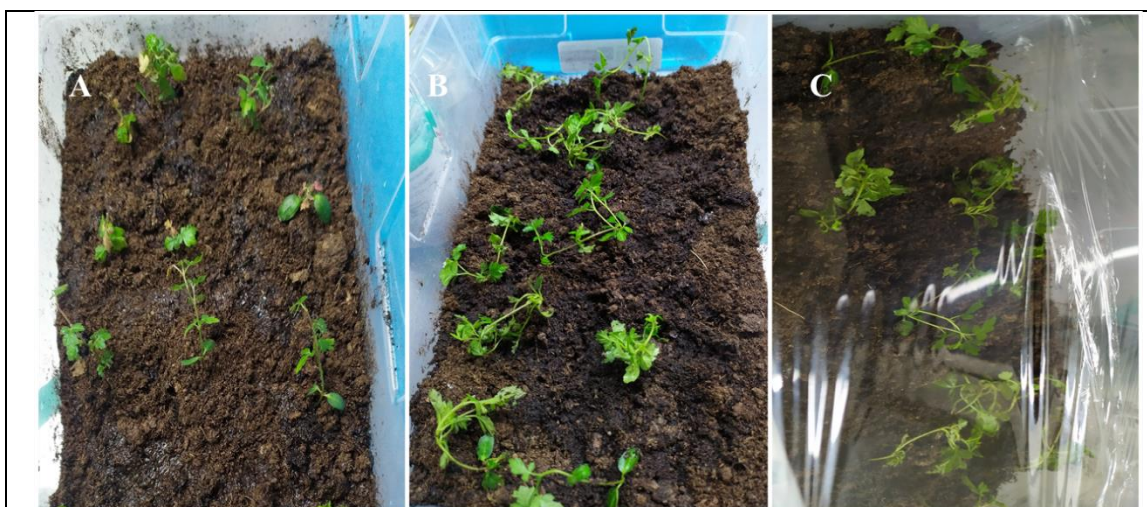


Figura 4.3 Establecimiento *ex vitro* de vitroplantas de agrillo al día cero TB1. Medio semisólido (A); TB3 en SIT con 20 min de inmersión (B, C). SIT. Sistema de Inmersión Temporal

Por la tanto para el establecimiento *ex vitro* las plantas deben adaptarse, de una condición heterótrofa (en donde la fuente de carbono es agregada al medio de cultivo), a una nutrición autótrofa. El tratamiento TB1. Medio semisólido resulto favorable en la supervivencia de las plantas alcanzando una aclimatación de 91.6% al día 15, logrando crecimiento y desarrollo en las hojas (figura 4.4 B).





Figura 4.4 Aclimatación de vitroplantas de agrillo en condiciones *ex vitro*

A) TB1 al día 0 (cero) de aclimatación *ex vitro*. B) Tratamiento TB1 al día 15 de aclimatación *ex vitro*. C-D) Tratamiento TB3 al día 15 de aclimatación *ex vitro*. TB1. Tratamiento control en medio semisólido, TB3. Tratamiento en biorreactor (SIT) con 20 minutos de inmersión. Escala: 0.5 cm.

Las plántulas *in vitro* deben ser de buena calidad y con un sistema radicular bien desarrollado, porque de ello depende el porcentaje de supervivencia *ex vitro*. En el caso de aclimatación para plántulas provenientes de biorreactor TB3. 20 min de inmersión (figura 4.4C-D) presento una baja supervivencia alcanzando una aclimatación del 25%, lo anterior se puede deber a las condiciones de desarrollo de la plántula que presentaba tallos alargados con una longitud de 9.33 cm, así como mayor número de brotes y hoja (figura 4.2 B, C) dificultando su establecimiento por altura y peso las plantas tendían a doblarse provocando el contacto con el sustrato, generando marchitez y ataque de microorganismos.

#### 4.1.6 Conclusiones

Un sistema de inmersión temporal acelera el desarrollo de agrillo y promueve la generación de brotes en cultivo *in vitro*, se estableció un tiempo óptimo de inmersión de 20 minutos con una frecuencia de 6 horas, el cual presenta generación de brotes y un crecimiento dos veces mayor a comparación del medio semisólido.

Un periodo prolongado de inmersión de 30 minutos cada 6 horas genera problemas de hiperhidricidad en la planta.

Para la aclimatación *ex vitro*, es necesario seleccionar explantes aptos y lavar para retirar el medio de cultivo, emplear sustratos y agua estériles para evitar el posible desarrollo de enfermedades fungosas. Además de proporcionar alta humedad en el contenedor empleando cubiertas plásticas para evitar pérdida por evapotranspiración.

El uso de explantes elongados no resulta favorable para la aclimatación por lo que se sugiere tomar en cuenta este parámetro para el establecimiento *ex vitro*. Sin embargo, con un tamaño de explante adecuado es posible lograr más del 90% de supervivencia en la aclimatación.

#### 4.1.7 Bibliografía

Adelberg, J.; Naylor-Adelberg, J.; Tascan M. (2007). Larger Plants From Liquid-Based Micropropagation: A Case Study With *Hydrangea quercifolia* Bartr. 'Sikes Dwarf'. Combined Proceedings International Plant Propagators Society. 57:1-10.

Agramonte Peñalver, D; Jiménez Terry, F.; Dita Rodríguez, M.A. (1998). Aclimatización. En: Pérez Ponce, J. N.( Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas. Sta. Clara, Villa Clara. Cuba, pp.193-206.

Ashraf, M., Aziz, M., Stanlas, J., Kadir, M. (2013). Optimization of immersion frequency and medium substitution on microtuberization of *Chlorophytum borivillanum* in RITA system on production of saponins. *Process Biochem.* 48,73–7

Basail M, Medero V, Torres M, López J, Santos A, Rayas A, Bauta M, Beovidez Y, Ortega A. (2013). Nueva alternativa para la micropropagación en inmersión temporal del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV2011' (AAB). *Revista Colombiana de Biotecnología* 15(1): 98-107

- Berthouly, M.; Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. pp 165-195. Springer Netherlands.
- Castro, D.C. y J.I. González. (2001). Control de condiciones ambientales y medio de cultivo para la propagación de *Eucalyptus grandis* en el sistema de inmersión temporal. *Actualidades Biolog.* 23(75): 13-18.
- Chávez-García, J. Antonio, Andrade-Rodríguez, María, Juárez-López, Porfirio, Villegas-Torres, Oscar G., Sotelo-Nava, Héctor, & Perdomo-Roldan, Francisco. (2018). Evaluación de tres sistemas de cultivo *in vitro* para la multiplicación de microcormos de gladiolo. *Revista fitotecnia mexicana*, 41(4a), 551-554.
- Debnath, S. C. 2005. Strawberry Sepal: another explant for thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant.* 41(5):671-676.
- Escalona, M. (2006). Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophyta anual.* pp. 48-50.
- Etienne, H., Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 69, 215–231.
- Flores García, Andrés, & Álvarez Moctezuma, José Guadalupe, & Rodríguez de la O, José Luis, & Corona Ambris, Alejandro. (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl.. *Foresta Veracruzana*, 10(2),27-33.
- García, M.; R. Quintero & A. López. (2004). *Biología alimentaria*. Edit. LIMUSA S.A: México.
- Georgiev-Vasil, Schumann-Anika, Pavlov-Atanas, Bley-Thomas. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*,14: 607–621
- Hernández-Soto A., Gatica-Arias A., Alvarenga-Venutolo S. (2008) Vaso fermentador de bajo costo para la micropropagación masiva de jengibre. *Agronomía Mesoamericana*. 19(1): 87-92.
- Jericó J. J, Bello-Bello J.J., Spinoso-Castillo J., Iglesias-Andreu L.G. (2014). Establecimiento de un sistema de biorreactores para la micropropagación de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) *Revista Agroproductividad* 7(7): 63-68 pp.
- Martre, P., Lacan, D., Just, D., Teison, C. (2001). Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 67: 25-35.
- Murashige, t.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Paek KY, Chakrabarty D, Hahn EJ. (2005). Application of bioreactor systems for large production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell. Tissue. Organ Cult.* 81:28-300.
- Paek KY, Hahn E-J, Son S-H. (2001). Application of Bioreactors for large-Scale Micropropagation Systems of Plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37:149-157.
- Preil, W. (2005). General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. p 1-18. En: Hvostlef-Eide AK, Preil W (Ed) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, Dordrecht.

Rohr, R.; Iliev, I.; Sca, I. A. and Tsouloha, P. 2003. Acclimatization of micropropagated forest trees. *Acta Hortic.* 616:59-69.

Sánchez, A.; D. Saavedra & H. Mauricio. (2012). Aclimatación y endurecimiento de materiales de palma de aceite obtenidos mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales. *Rev. Palmas*, 33(4): 41:52.

Sandoval, J.; G. Brenes & L. Pérez. (1991). Micro propagación del “plátano” y “banano” (Musa AAB, AAA) en el CATIE. Edit. Bib. Orton IICA / CATIE: Costa Rica.

Steingroewer, J., Bley, T., Georgiev, V., Ivanov, I. *et al.* (2013) Bioprocessing of differentiated plant in vitro systems. *Eng. Life Sci.* 13, 26–38.

Ziv, M. (2005). Simple bioreactors for mass propagation of plants. pp 79-94. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, Dordrecht.

## 5. CAPÍTULO 5.

### 5.1 Discusión general y conclusiones

El agrillo es una especie de gran interés debido a la demanda que tiene su fruto para la elaboración de productos alimenticios, al ser una planta silvestre se dificulta su ubicación y recolección, lo que repercute en la oferta y costos de venta. Una estrategia para aumentar significativamente la disponibilidad del fruto radica en establecer cultivos comerciales, para llevarlo a cabo se deben establecer protocolos de propagación para la generación de plantas. El cultivo *in vitro* se propone como una alternativa para conseguir este propósito. Actualmente existen investigaciones sobre el cultivo *in vitro* en el género: *Rhus coriaria*, *Rhus typhina* (Safarnejad, 2011; Borschevskyi, 2013).

A partir de los protocolos mencionados se implementaron diversas estrategias para la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de la especie *Rhus allophylloides*.

En el presente trabajo se realizó un protocolo de propagación *in vitro* en medio semisólido y posteriormente un escalamiento en biorreactor en el (SIT) sistema de inmersión temporal. El método de propagación empleado fue vía cultivo de nudos, que consiste en la inducción de brotes adventicios y raíces en los explantes cultivados a partir de nudos como explante inicial, la propagación de microesquejes es un método que garantiza alta uniformidad genética de las plántulas. (George y Debergh, 2008).

Para el establecimiento es necesario la selección de un explante adecuado, los cuales se obtienen de plantas formadas mediante la germinación *in vitro* o explantes *ex vitro*, en este trabajo se utilizaron microesquejes (segmentos nodales) provenientes de germinación *in vitro*; esta última resulta una estrategia para la generación de explantes sanos (Fay *et al.*, 1992; Pierik *et al.*, 1993).

Los resultados en la germinación *in vitro* de semillas de agrillo presentaron un efecto positivo con el uso de reguladores de crecimiento. La adición de BAP a concentraciones entre 0.5 - 2 mg L<sup>-1</sup> resulta en un mayor porcentaje y velocidad de germinación comparado con el control (medio en ausencia de regulares de crecimiento). Se observó un efecto similar en la especie *Lotus corniculatus* en el que se demostró un porcentaje de germinación de 30% (sin reguladores de crecimiento) y con la adición de 0.05 mg L<sup>-1</sup> BAP aumento hasta el 80% (Ibisch, 2003).

Después de la germinación se observó que las plántulas *in vitro* comenzaron a generar callo adventicio causado por algún factor de estrés que afectaba su desarrollo y posteriormente moría la plántula. El desarrollo, características fisiológicas y morfológicas están influenciadas por el ambiente físico, químico y gaseoso de los recipientes (Kozai, 1992). Por lo que se evaluaron posibles factores de estrés (intensidad lumínica y presencia de etileno) como resultado se obtuvo que el flujo de fotones fotosintético utilizado entre 57 a 37  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD, no fue un factor que afectara el desarrollo de la planta *in vitro*; sin embargo, la implementación de un sistema semiabierto, permitió el desarrollo de plantas de agrillo comparado con los sistemas cerrados, debido a la acumulación de gases que pudo efectar el desarrollo del explante, posiblemente etileno (Kumar, 1998).

Debido a los resultados anteriores se implementó un sistema semiabierto para la evaluación de reguladores de crecimiento para la multiplicación y enraizamiento *in vitro* a partir de nudos (explante inicial). Se utilizó una combinación de reguladores de crecimiento BAP y AIB en el medio semisólido, en cual se logró mayor generación de brotes con la adición de 1 mg L<sup>-1</sup> BAP, sin embargo, a excepción de 0.05 mg L<sup>-1</sup> AIB en ningún tratamiento se logró la generación de raíz en los microesquejes.

Por lo anterior se montó un nuevo experimento para inducir el sistema radicular, logrando generar la mayor longitud y número de raíces en los microesquejes en un medio de cultivo con una concentración al 50% del medio MS con auxinas ( $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  AIB +  $0.2 \text{ mgL}^{-1}$  ANA). El proyecto de investigación desarrollado en el presente trabajo permitió establecer las condiciones óptimas (sistema semiabierto e intensidad de luz) para el cultivo *in vitro* de agrillo.

Además, se logró establecer un protocolo de regeneración *in vitro* en dos etapas (multiplicación y enraizamiento). En el caso de *Schinus molle* L. (Ayala, 2011), especie perteneciente a la misma familia del agrillo, se reportó el establecimiento de un protocolo de regeneración de una sola etapa. Por lo que se sugiere como trabajos futuros la continuación de la optimización del protocolo de regeneración del Agrillo, para inducir la generación de brotes y raíces en una sola etapa.

Con base a los resultados obtenidos en el medio semisólido se realizó un escalamiento a biorreactores (SIT) sistema de inmersión temporal. Etienne y Berthouly (2002) explican las ventajas de su uso, dentro del presente estudio destaco que facilito la mano de obra, ahorro de espacio y permitió llevar a cabo una automatización. En el presente trabajo se empleó el medio MS liquido con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BAP se obtuvo una aceleración en el desarrollo y generación de brotes en el cultivo *in vitro* de agrillo, logrando un crecimiento hasta dos veces mayor a comparación del medio semisólido. Sería importante realizar diversas pruebas en cuanto a la respuesta a diferentes frecuencias de inmersión, ya que en el presente trabajo se evaluaron los tiempos de inmersión a la misma frecuencia 6 hrs.

Finalmente se realizó la aclimatación donde se establecieron explantes provenientes de medio semisólido logrando un porcentaje de aclimatación de 91.3%, sin embargo, en medio líquido disminuyó a un porcentaje de 25%, esto podría deberse a las condiciones del explante (tallos delgados y alargados). Para superar esta dificultad en *Castanea sativa* se involucra una fase de endurecimiento, utilizando cubos de lana de roca como soporte para mantener los explantes en posición vertical, logrando obtener un mayor porcentaje de aclimatación en el medio líquido (Vidal, 2015).

Los resultados presentados en esta tesis muestran el establecimiento de un protocolo de propagación *in vitro* de agrillo, eliminando factores de estrés y evaluando el efecto de los reguladores de crecimiento para estimular la germinación, multiplicación y enraizamiento *in vitro* el cual resultó favorable.



Con base a los resultados generados en la presente tesis se proponen los siguientes protocolos (figura 5.1):

- A. **Protocolo de germinación de semillas de agrillo en medio semisólido en un sistema semiabierto:** 1) Etapa de establecimiento. Desinfección de semillas. 2) Germinación de semillas. Semillas en medio semisólido MS sin reguladores de crecimiento, en condiciones de obscuridad durante 15 días, posteriormente se transfiere a condiciones de fotoperiodo, sin cambio de medio hasta los 30 días de cultivo, la duración de esta etapa es durante 60 días. 3) *Aclimatación de plántulas*. Establecer plántulas *ex vitro*
- B. **Protocolo de propagación de plantas de agrillo en medio semisólido en un sistema semiabierto:** 1) Germinar semillas *in vitro* en medio MS semisólido sin reguladores de crecimiento, 2) *Etapa de Multiplicación*. Obtener microesquejes a partir de plántulas obtenidas por germinación y establecerlas en medio MS con  $1\text{mg L}^{-1}$  de BAP durante 60 días en fotoperiodo 16h luz ( $32\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  PPFD). 3) *Etapa de enraizamiento*, colocar los explantes de la etapa de multiplicación en una concentración del 50% de medio MS con  $0.5\ \text{mg L}^{-1}$  de AIB y  $0.2\text{mg L}^{-1}$  de ANA durante 30 días. 4) *Aclimatación de plántulas ex vitro*.
- C. **Protocolo de propagación de plantas de agrillo en Biorreactor, Sistema de Inmersión Temporal (SIT):** 1) Germinar semillas *in vitro* en medio MS semisólido sin reguladores de crecimiento, 2) *Etapa de Multiplicación*. Obtener plántulas a partir de germinación y establecerlas en medio MS con  $1\text{mg L}^{-1}$  de BAP en SIT con 20 minutos de inmersión con una frecuencia cada 6 horas durante 30 días en fotoperiodo 16h luz a una temperatura de  $26\pm 2^\circ\text{C}$ . 4) *Aclimatación de plántulas ex vitro*.

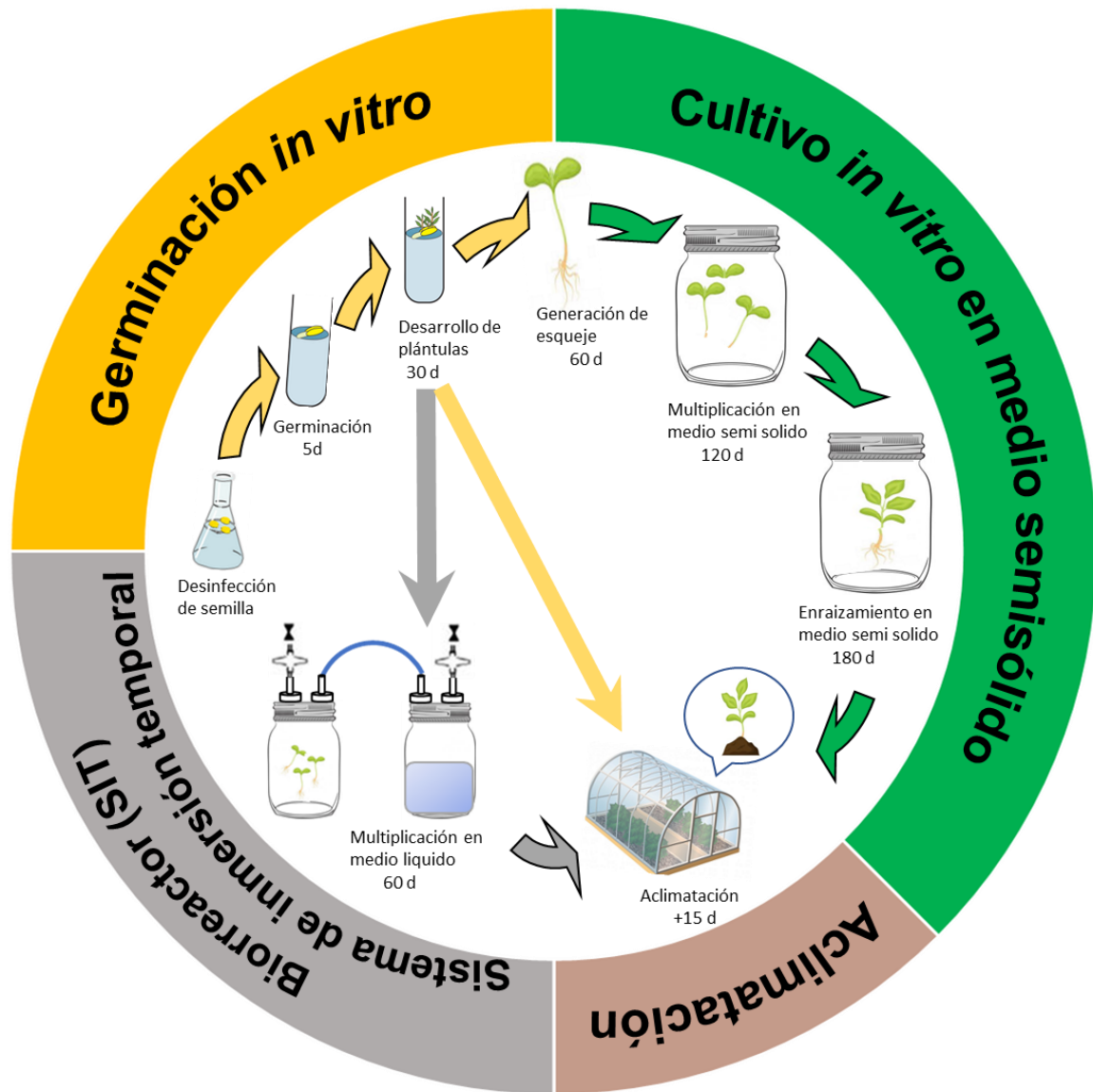


Figura 5.1 Esquema integrador de protocolos de propagación *in vitro* de plantas de agrillo.

El uso de un sistema de inmersión temporal es recomendable para promover el desarrollo y la generación de brotes, sin embargo falta mejorar el desarrollo del sistema radicular y promover el endurecimiento de la plántula, una estrategia es acortar el tiempo de multiplicación en el biorreactor, manteniendo las plántulas en esta etapa durante 15 días y posteriormente cambiar el medio de cultivo para inducir el desarrollo del sistema radicular de la plántula, agregando reguladores de crecimiento (auxinas) y empleando el 50% de la concentración del medio MS, en esta última etapa se buscaría forzar a la planta a sintetizar sus propios carbohidratos al disminuir la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, por otro lado también se podrían probar diversas bases (cubos de lana de roca, gel, espuma) dentro del sistema de inmersión temporal para mantener en una posición vertical el explante para tratar de promover el endurecimiento de la plántula *in vitro*.

### 5.1.1 Bibliografía

Ayala, A. N. (2011). Establecimiento de cultivo *in vitro* de molle (*schinus molle* L.) a partir de yemas axilares tomadas de plantas madre como una herramienta para la propagación de la especie en el distrito metropolitano de Quito. Escuela politécnica del ejército. 125-127.

Borshevsky M. O. & Kitaev O. I. (2013). Frost resistance of *Rhus typhina* L. in habitats with different levels of anthropogenic transformation. – Scientific Bulletin of Ukrainian National Forestry University 23.16: 69–73.

Etienne, H., Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell Tissue Organ Cult. 69, 215–231.

Fay, M.F., 1992. "Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods". *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 28: 1-4.

George EF, Debergh PC. (2008). Micropropagation: Uses and Methods. En: George, EF, Hall M A, De Klerk GJ (Eds) Plant propagation by tissue culture 3rd Edition, pp. 29-64. Springer. Dordrecht.

Ibisch PL, Mérida G. (2003). Biodiversidad: La riqueza de Bolivia. Ed. FAN-Bolivia. Santa Cruz de la Sierra. 638 pp.

Kozai, T, Fujiwara M, Hayashi M y Aitken-Christie J. (1992). The *in vitro* environment and its control in micropropagation. En: Kurata, K. y Kozai. Transplant Production Systems, pp. 247-282.

Kumar, P. P., Lakshmanan, P. and Thorpe, T. A. (1998). Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 34: 94-103.

Pierik, R.L.M. (1993). "Micropropagation: Technology and Opportunities". En: Plant biotechnology commercial prospects and problems (Prakash, J.; Pierik R.L.M., Eds.), Science Publishers, Inc., Lebanon, pp. 9-22.

Safarnejad Abbas, Saycdch Bi Bi. Layla Alamdari. (2011). Tissue culture in medicinal plant of sumac (*rhus coriaria*). *International Journal of Science and Nature, I.J.S.N.* ,VOL. 2(4) 2011: 760-763.

Vidal, N.; Blanco, B.; Cuenca, B. (2015). A Temporary Immersion System for Micropropagation of Axillary Shoots of Hybrid Chestnut. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 123: 229-243.