

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Achiote (<i>Bixa orellana</i> L.)	2
2.1.1 Sistemática de <i>Bixa orellana</i>	2
2.1.2 Descripción botánica	3
2.1.2.1 Forma	3
2.1.2.2 Hoja	4
2.1.2.3 Flor	4
2.1.2.4 Fruto	4
2.2 Descripción del pigmento	5
2.2.1 Biosíntesis de Bixina	6
2.3 Importancia económica	7
2.4 Usos	8
2.4.1 Usos en la industria alimenticia	8
2.4.2 Usos medicinales	9
2.5 Plagas y enfermedades	10
2.6 Cultivo de la planta	10
2.6.1 Hábitat	10
2.6.2 Propagación	11
2.7 Cultivo de tejidos vegetales	12
2.8 Reguladores de crecimiento	13
2.8.1 La relación auxina / citocinina	14
2.8.2 Auxinas	15
2.8.2.1 Efectos de las auxinas	16
2.8.2.2 Biosíntesis de las auxinas	16
2.8.3 Citocininas	17
2.8.3.1 Biosíntesis	17

	Página
2.8.3.2 Efectos fisiológicos producidos por las citocininas	18
2.9 Thidiazuron	18
2.9.1 TDZ en el cultivo de callos	20
2.9.2 TDZ en la producción de brotes	21
2.9.3 Modo de acción del TDZ	22
2.9.4 Otros efectos del TDZ	23
2.9.4.1 Brotes transgénicos	23
2.9.4.2 Transformación genética	23
2.9.4.3 Embriogénesis somática	25
2.9.4.4 Cultivo de protoplastos	25
2.9.5 Efectos negativos del TDZ	26
2.9.5.1 Vitrificación	26
2.9.5.2 Formación de brotes cortos	26
III. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo General	28
3.2 Objetivos específicos	28
IV. HIPÓTESIS	29
V. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1 Material biológico	30
5.2 Diseño experimental	30
5.3 Material de laboratorio	31
5.4 Componentes y reactivos	31
5.5 Método para la asepsia de semillas	31
5.6 Condiciones de pregerminación	32
5.7 Germinación	32
5.8 Preparación de las soluciones concentradas (Stock) de TDZ	32

	Página
5.9 Preparación del medio de cultivo	33
5.9.1 Fase de inducción	34
5.9.1.1 Hipocotilos	34
5.9.1.2 Hojas	35
5.9.1.3 Raíz	35
5.9.2 Resiembras (subcultivos)	35
5.9.3 Fase de mantenimiento	36
5.10 Enraizamiento	36
5.11 Transferencia de plantas enraizadas a condiciones <i>ex vitro</i>	36
5.12 Protocolo de transformación	37
5.12.1 Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
5.12.2 Detección histoquímica de la actividad de la β -glucuronidasa (gen gus)	39
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1 Germinación	40
6.2 Inducción de brotes	40
6.2.1 Evaluación de hipocotilos a los 60 y 90 días con resiembra	43
6.2.2 Evaluación de raíces a los 60 y 90 días con resiembra	47
6.3 Mantenimiento	52
6.4 Enraizamiento de brotes	54
6.5 Transferencia de plantas enraizadas a condiciones <i>ex vitro</i>	58
6.6 Evaluación de hipocotilos y raíces a los 60 y 90 días sin resiembra	60
6.7 Transformación de explantes de <i>Bixa orellana</i> L.	62
6.7.1 Respuesta al antibiótico kanamicina	63
6.7.2 Verificación de plantas transgénicas de achiote para el gen gus	65
VII. CONCLUSIONES	67
VIII. PERSPECTIVAS	68
IX. APÉNDICE	69
X. BIBLIOGRAFÍA	70

RESUMEN

En el presente estudio se estableció un protocolo de regeneración utilizando explantes de hipocotilos, hojas y raíces de plántulas germinadas de semillas de achiote de la variedad Peruana en el cual se determinaron los efectos producidos utilizando el regulador de crecimiento denominado Thidiazuron (TDZ) (N-phenyl-N-1,2,3-thiazol-5-yl-urea) en las siguientes concentraciones (μ M): 0.0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.25, 0.35, 0.5, 1.0, 5.0. El rango óptimo de concentración de TDZ en el cual se puede obtener formación de brotes para explantes de hipocotilo y raíces en concentraciones de 0.01 y de 0.05 μ M respectivamente. En explantes de hoja no se obtuvo respuesta de morfogénesis en las concentraciones de TDZ probadas. Además se efectuaron resiembres en medios con diferentes concentraciones del TDZ y en otros medios se dejaron sin efectuar resiembres observando que cuando se efectúan resiembres cada 30 días se obtiene un mejor desarrollo del brote. Se establecieron las condiciones de mantenimiento de los brotes transfiriendo a medios con y sin TDZ. Al transferir los brotes a medio con TDZ estos desarrollaron callos de tamaño considerable en su base y de ahí pequeños brotes, mientras que en los medios sin TDZ solo desarrolló un callo muy pequeño en su base. También se indujo la formación de raíces a los brotes generados de los explantes con una concentración de 1.5 mg/L de IBA. Se establecieron las condiciones para enraizar plantas al ser transferidos los brotes con raíz en macetas con tierra y agrolita (1:1) (dándoles un tratamiento previo con benlate al 1%) y su posterior adaptación al invernadero con una temperatura de 25- 30 ° C y una intensidad de luz de 300-350 μ mol $m^{-2} s^{-1}$ y su adaptación a el sombreadero.

Se realizó un experimento adicional de transformación genética de los explantes de hipocotilo y raíz utilizando las concentraciones de TDZ en la inducción de brotes transformados y se observó que desarrollaron brotes bien diferenciados en explantes de hipocotilo, mientras que en los explantes de raíz se obtuvo solo yemas, o brotes iniciales. Haciendo la prueba histoquímica de gus para determinar si la transformación se había efectuado, dando positivo solo para las yemas desarrolladas de explantes de raíz.