

## INDICE

|   |    |
|---|----|
| INDICE .....  | I  |
| RESUMEN .....   | IV |
| CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN .....   | 1  |
| 1.1 GENERALIDADES DE LA ESPECIE .....   | 3  |
| 1.1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y TAXONÓMICA .....   | 3  |
| 1.1.2 USOS E IMPORTANCIA ECONÓMICA .....  | 6  |
| 1.1.3 PROBLEMAS DEL CULTIVO .....   | 7  |
| 1.1.4 SOLUCIONES A LA PROBLEMÁTICA .....  | 11 |
| 1.1.5 LA BIOTECNOLOGÍA COMO HERRAMIENTA PARA EL MEJORAMIENTO VEGETAL .....              | 11 |
| 1.2 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES .....  | 13 |
| 1.2.1 MEDIO DE CULTIVO .....  | 13 |
| 1.2.2 REGULADORES DE CRECIMIENTO .....  | 14 |
| 1.3 ORGANOGÉNESIS .....   | 16 |
| 1.4 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA .....  | 17 |
| 1.4.1 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA .....                                      | 19 |
| 1.4.2 DESARROLLO .....  | 19 |
| 1.4.3 PROLIFERACIÓN .....   | 20 |
| 1.4.4 MADURACIÓN .....  | 20 |
| 1.5 TIPOS DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA .....   | 21 |
| 1.5.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA SECUNDARIA .....   | 22 |
| 1.5.2 EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA VS. SOMÁTICA .....   | 22 |
| 1.5.3 MULTIPLICACIÓN, MADURACIÓN Y CONVERSIÓN EN PLANTA .....                           | 23 |
| 1.5.4 FACTORES QUE AFECTAN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA .....                              | 29 |
| 1.5.5 APLICACIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA .....                                     | 34 |
| 1.6 TÉCNICAS DE INMERSIÓN TEMPORAL .....  | 36 |
| 1.6.1 BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL RITA® .....                                   | 37 |
| 1.7 ANTECEDENTES DEL CULTIVO IN VITRO DE CEDRO ROJO .....                               | 43 |
| CAPÍTULO 2 JUSTIFICACIÓN .....  | 48 |
| CAPÍTULO 3 OBJETIVOS .....  | 51 |
| 3.1 OBJETIVO GENERAL .....  | 52 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 52 |
| CAPÍTULO 4 MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 53 |
| 4.1 MATERIALES .....  | 54 |
| 4.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....  | 54 |
| 4.1.2 LUGAR EXPERIMENTAL .....  | 55 |
| 4.1.3 MEDIOS DE CULTIVO .....   | 55 |
| 4.2 MÉTODOS .....   | 55 |
| 4.2.1 AXENIFICACIÓN DE LOS FRUTOS .....   | 55 |
| 4.2.2 EXTRACCIÓN DE SEMILLAS Y EMBRIONES CIGÓTICOS .....                                | 56 |
| 4.2.3 DESINFECCIÓN DE SEMILLAS Y GERMINACIÓN .....                                      | 57 |
| 4.2.4 OBTENCIÓN DE EXPLANTES .....  | 59 |
| 4.2.5 EFECTO DEL CARBÓN ACTIVADO .....  | 60 |
| 4.2.6 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA .....                                      | 61 |
| 4.2.7 APLICACIÓN DEL SISTEMA RITA PARA LA PROLIFERACIÓN DE MASAS PROEMBRIOGÉNICAS ..... | 62 |
| 4.2.8 ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS EMBRIONES .....                                       | 64 |
| CAPÍTULO 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....   | 65 |

|   |     |
|---|-----|
| 5.1 ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....   | 66  |
| 5.1.1 ELIMINACIÓN DE HONGOS CON ANTRAK Y MANZATE.....   | 66  |
| 5.1.2 APLICACIÓN DEL BACTERIOESTATICO PPM Y EL ANTIMICROBIANO VITROBAF EN EL CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN POR BACTERIAS..... | 67  |
| 5.1.3 APLICACIÓN DE HIPOCLORITO DE SODIO.....   | 69  |
| 5.2 GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS.....  | 72  |
| 5.3 EFECTO DEL CARBÓN ACTIVADO EN EL CONTROL DE LA FENOLIZACIÓN.....  | 73  |
| 5.4 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....   | 75  |
| 5.5 MULTIPLICACIÓN DEL CALLO EMBRIOGÉNICO.....  | 81  |
| 5.5 SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL RITA®.....  | 82  |
| 5.6 PRUEBAS HISTOLÓGICAS.....   | 87  |
| 5.7 PERSPECTIVAS.....   | 90  |
| CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES.....  | 91  |
| 6.1 ESTABLECIMIENTO DE EXPLANTES DE TALLO.....  | 92  |
| 6.2 INDUCCIÓN A PARTIR DE EMBRIÓN CIGÓTICO.....   | 92  |
| CAPÍTULO 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 94  |
| CAPÍTULO 8 ANEXOS.....  | 106 |
| 8.1 ANEXO 1. MEDIO DE CULTIVO MS MURASHIGUE & SKOOG (1962).....   | 107 |
| 8.2 ANEXO 2. MEDIO DE CULTIVO B5 DE GAMBORG (1968).....   | 108 |
| 8.3 ANEXO 3. MEDIO DE CULTIVO WPM LLOYD & MCCOWN (1981).....  | 109 |
| 8.4 ANEXO 4. SOLUCIÓN DE ANTIOXIDANTES.....   | 110 |
| 8.5 ANEXO 5. TÉCNICA HISTOLÓGICA.....   | 110 |
| 8.6 ANEXO 6. GLOSARIO.....  | 111 |

## INDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1. FRUTOS VERDES, HOJAS, FRUTOS SECOS Y SEMILLAS DE CEDRO ROJO..... | 5  |
| FIGURA 2. ETAPAS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....                         | 28 |
| FIGURA 3. APLICACIONES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....                   | 36 |
| FIGURA 4. RECIPIENTES DE INMERSIÓN TEMPORAL AUTOMATIZADOS.....             | 38 |
| FIGURA 5. FLUJO DE AIRE EN EL SISTEMA.....                                 | 39 |
| FIGURA 6. FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA RITA.....                             | 40 |
| FIGURA 7. ÁRBOL DE CEDRO ROJO.....   | 54 |
| FIGURA 8. FRUTO, SEMILLA Y EMBRIÓN CIGÓTICO.....                           | 56 |
| FIGURA 9. DESINFECCIÓN DE LAS SEMILLAS DE CEDRO.....                       | 58 |
| FIGURA 10. DISECCIÓN DE EXPLANTES PARA EL PROCESO DE INDUCCIÓN.....        | 60 |
| FIGURA 11. MANEJO DEL EQUIPO DE RITAS.....                                 | 63 |
| FIGURA 12. PLANTULAS DE CEDRO.....   | 71 |
| FIGURA 13. CARACTERIZACIÓN DE CALLOS.....                                  | 78 |
| FIGURA 14. EMBRIOGÉNESIS REPETITIVA.....                                   | 80 |
| FIGURA 15. ESTRUCTURAS EMBRIOGÉNICAS OBSERVADAS EN ESTEREOSCOPIO.....      | 84 |
| FIGURA 16. ETAPAS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CEDRO ROJO.....          | 87 |
| FIGURA 17. CORTE HISTOLÓGICO DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS.....               | 88 |

## INDICE DE TABLAS.

|  |    |
|--|----|
| TABLA 1. COMPUESTOS EMPLEADOS PARA EL PROCESO DE DESINFECCIÓN.....   | 57 |
| TABLA 2. MATRICES DE ANTIFÚNGICOS (MANZATE Y ANTRAK), VITROBAF E HIPOCLORITO DE SODIO USADAS. ....                   | 59 |
| TABLA 3. PRUEBAS DE CARBÓN ACTIVADO.....   | 61 |
| TABLA 4. CONCENTRACIONES EN MG.L-1 DE LOS REGULADORES EMPLEADOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA. .... | 62 |
| TABLA 5. TIEMPOS Y FRECUENCIA DE INMERSIÓN.....  | 63 |
| TABLA 6. EFECTO DE LOS ANTIFÚNGICOS ANTRAK Y MANZATE.....  | 66 |
| TABLA 7. EFECTO DEL VITROBAF EN EL CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN BACTERIANA.....                                       | 68 |
| TABLA 8. EFECTO DEL HIPOCLORITO DE SODIO EN LA CONTAMINACIÓN BACTERIANA Y LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS.....            | 70 |
| TABLA 9. EFECTO DEL CARBÓN ACTIVADO EN EL CONTROL DE LA FENOLIZACIÓN. ....   | 74 |
| TABLA 10. INDUCCIÓN EN MEDIO WPM Y MS CON LOS RCV 2,4-D-BAP Y DICAMBA-BAP .....                                      | 76 |
| TABLA 11. DESCRIPCIÓN DE LOS TIPOS DE CALLOS.....  | 78 |

## INDICE DE GRAFICOS

|   |    |
|---|----|
| GRAFICO 1. DESARROLLO DE LAS PLÁNTULAS DE CEDRO ..... | 72 |
| GRAFICO 2. INCREMENTO DE BIOMASA EN RITAS.....        | 83 |

## RESUMEN

El cedro rojo es la segunda especie forestal tropical más importante del mundo, tiene alta demanda para reforestación y plantaciones comerciales en el sureste de México. Actualmente, existe varias limitantes para su aprovechamiento comercial a gran escala, entre ellas se encuentra la carencia de variedades altamente productivas y tolerantes a factores bióticos (ataque del barrenador de yemas) y abióticos, falta de disponibilidad en calidad y cantidad de materiales para iniciar plantaciones comerciales.

Por lo tanto, la regeneración de plantas mediante la embriogénesis somática representa por un lado una vía alternativa para la propagación masiva de especies forestales y por el otro, un sistema potencialmente eficiente de transformación genética. La presente investigación tuvo como objetivo general estandarizar y establecer un sistema de inducción y regeneración *in vitro* de embriones somáticos en medios semisólido y en recipientes de inmersión temporal automatizados (RITA) para el desarrollo y la proliferación del tejido embriogénico.

Los resultados demostraron que es posible el establecimiento de un sistema de axenificación de explantes a partir de semillas inmaduras de cedro rojo. Con la aplicación de 13.57  $\mu\text{M}$  de Dicamba al medio MS (Murashigue y Skoog, 1962) fue posible la inducción de la embriogénesis somática indirecta a partir de embriones cigóticos inmaduros, con alrededor de un 23% de respuesta de los tejidos a las 28 semanas de su cultivo.

En el manejo del sistema de inmersión temporal RITA<sup>®</sup>, se determinó que con 3 minutos de inmersión y una frecuencia de 4 horas en medio líquido MS sin reguladores de crecimiento vegetal y sacarosa a 30 g.L<sup>-1</sup> la masa embriogénica incrementó su peso fresco en un 300% a las 4 semanas de establecido el cultivo. Se observó que había presencia de todas las etapas de la embriogénesis somática. Los embriones en estado cotiledonar estuvieron bien diferenciados pero no presentaron desarrollo de raíces.

Este trabajo representa el primer reporte del establecimiento de un sistema de embriogénesis somática en cedro rojo en biorreactores RITA<sup>®</sup> sentando las bases para que a futuro se logre un sistema eficiente para la micropropagación masiva de plántulas *in vitro*.