

11  
Dej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE CALLOS Y  
CELULAS EN SUSPENSIÓN DE Physalis ixocarpa  
Brot. (Solanaceae)

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
MARIO ARCE MONTOYA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

	pag
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	
1. Sistemática e importancia de <u>Physalis ixocarpa</u> Brot.	4
2. Problemática de su producción en Xochimilco	6
3. Cultivo de tejidos vegetales y la Selección <u>in vitro</u>	10
3.1 Cultivo de callos	16
3.2 Cultivo de células en suspensión	20
3.3 Estimación del crecimiento en los cultivos celulares	21
3.4 Análisis estadístico en el cultivo de tejidos	22
4. Cultivo <u>in vitro</u> de <u>Physalis ixocarpa</u> Brot.	23
OBJETIVOS	25
MATERIAL Y METODOS	
1. Obtención de material biológico	26
1.1 Desinfección superficial de semillas	
1.2 Obtención de plántulas y extracción de explantes	
2. Cultivo de callos	27
2.1 Prueba preliminar I	
2.2 Prueba preliminar II	
2.3 Prueba Final	
3. Cultivo de células en suspensión	32
3.1 Establecimiento del cultivo en suspensión	
3.2 Determinación del crecimiento	
4. Métodos de análisis microscópico	33
RESULTADOS	
1. Cinética de germinación de semillas	35
2. Cultivo de callos	36
2.1 Prueba Preliminar I	
2.2 Prueba Preliminar II	
2.3 Prueba Final	
3. Cultivo de células en suspensión	51
4. Análisis microscópico	54
DISCUSION Y CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFIA	68
APENDICE A	
Preparación del Medio Murashige Skoog	74
APENDICE B	
Análisis de varianza para rangos de Kruskal-Wallis	76

APENDICE C	
Comparación múltiple para sumas de rangos de Kruskal-Wallis	79
APENDICE D	
Prueba U de Mann-Whitney	80
APENDICE E	
Análisis de varianza para rectas de regresión	62
APENDICE F	
Transformación Melford	34

## INDICE DE ILUSTRACIONES

	pag.
Figura 1. Estrategia general para la selección <u>in vitro</u> de variantes somaclonales y regeneración de plantas tolerantes a condiciones selectivas	15
Figura E1. Transformación Walford	35
Foto 1. Agregados en cultivos celulares provenientes de explantes foliares, mostrando rizogénesis	51
Foto 2. Agregados en cultivos celulares provenientes de explantes de hipocotilo	52
Foto 3. Pequeños agregados celulares de los cultivos en suspensión provenientes de explantes de hipocotilo	52
Foto 4. Agregados celulares teñidos con lugol que muestra la distribución de los plastidios conteniendo almidón	55
Foto 5. Detalle de la fotografía anterior que muestra la distribución de los plastidios alrededor del núcleo	56
Foto 6. Célula parenquimatosa, proveniente de explantes de hipocotilo	56
Foto 7. Extremo de un explante de hipocotilo que muestra la proliferación celular inducida	57
Foto 8. Callo proveniente de explantes de hipocotilo mostrando la presencia de células vasculares	58
Gráfica 1. Cinética de germinación de semillas de <u>Physalis ixocarpa</u> Brot. var. Rendidora	35
Gráfica 2. Curva de inducción de callos a partir de explantes foliares en medio D5E6	45
Gráfica 3. Curva de inducción de callos a partir de explantes de hipocotilo en medio D6E8	46
Gráfica 4. Cinética de crecimiento en los cultivos en suspensión de células de hipocotilo en medio D6E8	53

## RESUMEN

La producción de Physalis ixocarpa Brot. en la zona chinampera de Xochimilco ha sido limitada por la alta salinidad que presentan los terrenos. Una de las alternativas propuestas para la solución del problema, es la obtención de variedades tolerantes a las condiciones presentes en los suelos salinos. En este sentido, el uso de los métodos convencionales de fitomejoramiento han tenido poco éxito, por lo cual se ha abordado el empleo de las técnicas in vitro, en particular la selección de líneas celulares tolerantes a salinidad en el medio de cultivo. Para ello, es necesario el establecimiento de cultivos celulares y su caracterización, objetivo de este trabajo.

Se logró un alto porcentaje en la inducción de callos a partir de explantes foliares en medio Murashige-Skoog enriquecido con 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 1  $\mu\text{M}$  de BAP, así mismo, en explantes de hipocotilo, el medio óptimo para la inducción, contenía 1  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 0.01  $\mu\text{M}$  de BAP. Se definieron las cinéticas de inducción de callo para ambos casos. Para el cultivo en suspensión se emplearon callos provenientes de hipocotilo, dado que los cultivos en suspensión, provenientes de explantes foliares, mostraban una tendencia a desarrollar raíces. Se definió la cinética de crecimiento del cultivo en suspensión establecido. Los cultivos de callos y en suspensión están constituidos por células parenquimatosas, de acuerdo al análisis microscópico realizado.

## INTRODUCCION

Al igual que el resto del mundo, nuestro país se enfrenta a un problema de fundamental importancia como es, el garantizar a la población alimentos suficientes para cubrir sus necesidades. Para ello, se requiere avanzar en la investigación sobre fuentes alternativas de alimentos; incrementar las áreas de terreno dedicadas al cultivo; así como la calidad y los rendimientos de la producción agrícola, a través del mejoramiento genético de las especies cultivadas. Lo anterior sin olvidar la necesidad de cambios en la estructura socioeconómica del país, que garanticen el acceso de toda la población a los alimentos producidos.

El tomatillo o tomate de cáscara Physalis pubescens L. se encontraba entre los principales productos agrícolas cultivados en el México prehispánico. Actualmente la especie cultivada, Physalis ixocarpa Brot. ocupa aproximadamente el 9% del área dedicada a la producción de hortalizas en el país (Garza J.L., 1984). Hasta 1980, en el Distrito Federal, la mayor producción de esta hortaliza provenía de la Delegación Xochimilco sin embargo hoy día, su cultivo ha sido abandonado en la región, entre otras razones, por las condiciones edáficas de los terrenos (Castillo G., 1986).

La zona chinampera de Xochimilco resulta de particular importancia puesto que, se ha estimado, podría cubrir una porción significativa de la demanda de productos hortícolas para la población del Distrito Federal (D.D.F., 1980), sin embargo muestra una elevada concentración de sales lo cual, al impedir el

desarrollo de los cultivos, constituye un obstáculo para el aprovechamiento de su potencial agrícola.

En la solución del problema de suelos salinos, se han explorado alternativas que van desde la regeneración de los terrenos hasta el mejoramiento genético de las especies cultivables con el fin de obtener variedades tolerantes a las condiciones que impone una alta concentración de sales en el medio.

En este sentido, los resultados obtenidos mediante los métodos de fitomejoramiento convencionales, han sido poco satisfactorios (Handa K.A., et al, 1982), por lo cual se ha considerado el empleo de los métodos in vitro para seleccionar material celular tolerante a elevadas concentraciones salinas, susceptible de ser utilizado como sistema para el estudio de las bases biológicas de dicha tolerancia o bien emplearlo en los programas de fitomejoramiento de la especie.

La primera etapa en la implementación de las técnicas de selección in vitro, es el establecimiento de cultivos celulares, callos y células en suspensión para la especie y variedad en cuestión, así como su caracterización. En este último aspecto, resulta de interés, el contar, con criterios de evaluación que muestren un alto grado de reproducción, permitiendo así, el análisis confiable de los resultados obtenidos en los métodos de cultivo de tejidos vegetales; y lograr la definición de estimadores precisos, especialmente en la descripción del crecimiento y desarrollo de poblaciones celulares.

## ANTE NTES

1. Sistemática e importancia de Physalis ixocarpa Brot.

Los nombres comunes, tomatillo, tomate de cáscara o tomate verde, son empleados indistintamente, para referirse a las especies Physalis pubescens L., P. angulata L., P. peruviana L. y P. ixocarpa Brot., esta última es la especie empleada en el presente trabajo y corresponde a la especie cultivada actualmente en nuestro país.

De acuerdo a Bold, Alexopoulos y Delevoryas (1980),

P. ixocarpa Brot. se encuentra ubicada taxonómicamente en:

Reino: Phyta (Plantae)  
 Division: Anthophyta  
 Clase: Dicotyledonae  
 Familia: Solanaceae  
 Genero: Physalis  
 Especie: P. ixocarpa

Si bien el género Physalis fué establecido por Linneaus en 1753 con un total de nueve especies, ha sido objeto de continuas revisiones, dada la complejidad del género, el amplio rango de variación encontrado, la ambigüedad de las descripciones y la indisponibilidad de algunos tipos. En 1958, Waterfall realizó una amplia revisión del género, en base a diversas colecciones, entre ellas la mexicana, en la cuál aporta la siguiente descripción para la especie:

Physalis ixocarpa Brotero ex Hornemann, Hortus Regius Botanicus Hafniensis, Sup. 26.1819; P. angulata Jacq. f. ex Nees, Linnaea 6:470.1831.

Anual, de 15 a 60 cm de altura, ramosa, glabra o revestida con tricomas cortos y esparcidos; hojas alternadas de 2 a 7 cm de longitud, ovadas u ovado-lanceoladas; cáliz 5-lobulado; corola acampanada-estrellada de 7 a 15 mm de longitud, con 5 puntos de color azul oscuro sobre el limbo, el cuál está recurvado cuando abre totalmente; con 5 estambres, anteras azules de aproximadamente 3 mm de longitud, fuertemente enroscadas después de la dehiscencia; filamentos delgados y filiformes a anchos cerca de la antera; estilo filiforme, el estigma capitado a truncado; pedúnculos florales de 3 a 5 cm de longitud; fruto bicarpelar; cáliz del fruto invaginado basalmente, de 2 a 2.5 (3) cm de longitud, casi globoso y frecuentemente está totalmente ocupado por el fruto; pedúnculos frutales usualmente de 3 a 8 cm de longitud; semillas casi orbiculares más o menos puntiagudas.

Waterfall propone la selección de un neotipo, probablemente de la colección mexicana, dado que Hornemann no seleccionó el holotipo y no citó material, sin embargo difiere la acción a la espera de un estudio más detallado de las especies del área.

El tomatillo, es un fruto muy empleado en nuestro país, como condimento en salsas y platillos típicos, la especie *P. pubescens* era cultivada ya en la época prehispánica (Garza J.L., 1984), encontrándose como uno de los principales productos.

Independientemente de sus valores nutritivos, en especies relacionadas, se han descubierto withanolidas, un tipo de lactonas esteroidales, cuya actividad antineoplásica ha centrado el interés de varios investigadores en la importancia farmacológica de las diversas especies del género (Bagchi A., et

al, 1984).

En nuestro país, se siembra entre los últimos días de julio y los primeros de agosto, para ser cosechado en los primeros días de noviembre. Las semillas son germinadas en almácigos y las plántulas son transplantadas al campo con una separación de 70 cm entre ellas y un metro entre las filas (Pallares M.D., 1986). En 1980 la superficie cosechada a nivel nacional fué de 11,130 Ha de riego y 7,684 Ha de temporal que significaron el 3.9% y 5%, respectivamente, del área dedicada al cultivo de hortalizas; con una producción de 159,797 ton (Garza J.L., 1984).

## 2. Problemática de su producción en Xochimilco.

En el Distrito Federal, las regiones productoras eran, en orden de importancia, Xochimilco, Tlalpan y Milpa Alta (SARH, 1983). Actualmente, en Xochimilco el cultivo de esta hortaliza se ha abandonado, al igual que el de otros productos, no obstante que el tomatillo es muy apreciado por los campesinos de la región y que se trata de un cultivo recomendado por el sistema de clasificación de tierras para uso potencial, elaborado por el Dpto. de Agrología de DETENAL, pues se consideraba que en la región no existían limitaciones para su desarrollo (Alfaro S.G., 1980).

Las razones de este abandono, son tanto de tipo socioeconómico como por los cambios edáficos que han sufrido las áreas dedicadas al cultivo agrícola (Castillo G., 1986), principalmente debidos a un incremento en la concentración de

sales por un exceso en la explotación de los mantos acuíferos y una drástica contaminación de los mismos.

La Delegación Xochimilco comprende quince pueblos, incluida la cabecera municipal, con una extensión total de 122.02 km<sup>2</sup>, correspondientes al 8.97% del Distrito Federal. Está situada al sureste de la entidad federativa, entre los paralelos 19°09' y 19°19' de latitud norte y los meridianos 98°56', 99°09' de longitud oeste y una altitud media de 2,274 msnm; tiene como límites políticos la Delegación Milpa Alta hacia el sur, al este la Delegación Tláhuac, al norte las Delegaciones Iztapalapa y Coyoacán y al oeste la Delegación Tlalpan. Su clima (cw) corresponde a templado húmedo con lluvias en verano (García de M. E., 1964).

La zona chinampera de Xochimilco se localiza sobre el ex-Lago de Xochimilco, al sureste del Valle de México y consiste de numerosas parcelas "flotantes", a manera de islotes, rodeadas de canales empleados para la comunicación entre ellas, su origen se remonta a la época prehispánica, por lo cual se le considera uno de los pocos sistemas agrícolas indígenas, que no fué abandonado después de la conquista (Rojas R.T., 1983).

De acuerdo al Plan Parcial de Desarrollo Urbano para la Delegación (D.D.F., 1980), Xochimilco representa a diferencia de otras Delegaciones de la zona central del D.F., una región urbano-rural en la cuál, las actividades agrícolas representaban el componente más importante de la estructura económica local, siguiendo en importancia el sector agropecuario, el industrial / y el de servicios. Sin embargo, actualmente la sobreexplotación de

los mantos acuíferos y la aportación de contaminantes al sistema lacustre ha provocado una sustancial reducción de la producción agrícola y en consecuencia un deterioro de la estructura económica. Es así como 3000 Ha de la extensión de la Delegación, que comprendían al antiguo vaso del Lago Xochimilco-Tláhuac y que se encontraban totalmente ocupadas por la zona chinampera, han pasado a cubrir una extensión de sólo 2000 Ha aproximadamente, mismas que se encuentran en peligro de perderse, de continuar la dinámica actual.

La sobreexplotación de los mantos acuíferos y el riego con aguas contaminadas o pesadas, provenientes de zonas de mayor altitud, trae como consecuencia que los suelos se enriquezcan con sales a una mayor rapidéz que su lixiviación. En el caso de la zona chinampera, el calcio ha sido absorbido preferentemente, de manera tal que el complejo absorbente está saturado principalmente por  $Ca^{++}$  y por  $Na^+$  en minoría, por lo cuál se clasifican como suelos sódicos con estructura no degradada, suelos salinos con complejo cálcico o Solonchaks (Duchaufour P., 1975). Estos suelos se caracterizan por su alto contenido de sales de calcio en forma de sulfatos, bicarbonatos, nitratos, etc.; durante la época de sequía y como consecuencia del ascenso de la solución del manto freático, muestran una tendencia a incrementar la concentración de sales en la superficie, manifestando eflorescencias blancas. Este suelo a menudo contiene caliza activa con un perfil poco diferenciado, las arcillas están floculadas y la estructura es grumosa y por tanto aireada.

La salinidad de los suelos, ocasionada por la acumulación de

iones sodio o calcio, constituye uno de los más serios problemas agrícolas en todo el mundo, dado que por sus efectos sobre el desarrollo y crecimiento vegetal, torna improductivas las áreas de cultivo, agravándose el problema, dado que constantemente se incrementa el porcentaje de áreas cultivables que pasan a dicha condición salina.

Aún cuando no están bien comprendidos los mecanismos que induce la elevada concentración de sales sobre el crecimiento vegetal, se reconocen básicamente tres factores: Por una parte, una elevada concentración salina reduce el potencial de agua en el suelo y con ello disminuye la disponibilidad de agua para la planta (Kramer J.P., 1969), un fenómeno conocido como "sequía fisiológica"; otro factor a considerar es la alcalinidad que caracteriza dichos suelos, llegando a alcanzar valores de pH que van desde 8 a 8.5, en suelos cálcicos y de 9 o mayores en suelos sódicos, lo que ocasionará principalmente, la indisponibilidad de una gran cantidad de nutrientes minerales, como es el caso del fósforo, manganeso, hierro, zinc, cobre, etc. (Russell W.E., 1961); finalmente otro factor es la toxicidad de ciertos iones para las células vegetales, particularmente en el caso del  $\text{Na}^+$  el cual, debido a su antagonismo con el ión  $\text{Ca}^{++}$ , en presencia de este último, tiende a ser acumulado en el interior de las células, elevando su concentración por encima de los niveles tóxicos, de acuerdo a observaciones hechas sobre la germinación de semillas (Guerrier G., 1983). Este último factor tiene una mayor importancia, por tanto, en el caso de los suelos cálcicos.

En la búsqueda de alternativas al problema de los suelos

salinos, se han empleado desde la regeneración de los terrenos, mediante desalado con agua dulce y acumulación de materia orgánica (Duchaufour P., 1975), hasta el mejoramiento genético de las especies cultivables, con el fin de obtener variedades productivas, que muestren tolerancia a las condiciones de suelos salinos.

En este último aspecto, los métodos de fitomejoramiento convencionales han dado resultados poco satisfactorios (Handa K.A., et al, 1982), atribuibles no sólo a las limitaciones inherentes a dichos métodos, sino también al escaso conocimiento que sobre los mecanismos de la tolerancia a las condiciones de suelos salinos se tienen hasta el momento.

Las anteriores razones, han llevado a considerar el empleo de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales para seleccionar material celular, de especies de interés agrícola, tolerante a elevadas concentraciones salinas el cual, podrá ser utilizado como modelo de estudio sobre las bases biológicas de dicha tolerancia, o bien empleado en los programas de fitomejoramiento para las especies.

### 3. Cultivo de Tejidos Vegetales y la Selección in vitro

Los métodos in vitro para el cultivo aséptico de células, tejidos, órganos y otras estructuras vegetales, denominadas comúnmente como cultivo de tejidos vegetales (CTV), han abierto nuevas posibilidades para la comprensión de fenómenos biológicos relacionados con los vegetales y muy particularmente, han

constituido una importante herramienta para eliminar algunas de las limitaciones que imponen las técnicas convencionales para la propagación masiva de plantas de interés comercial (Murashige T., 1974), en la obtención de plantas libres de patógenos (Quak F., 1977), la conservación de germoplasma (Rubluo I.A., 1985), la producción de metabolitos secundarios, fármacos u otros productos de origen vegetal (Loyola V.M. y Reyes L.J., 1985), así como en el mejoramiento genético, para la obtención de nuevas variedades (Green C.E., 1977; Carlson P.S. y Polacco C.J., 1975; Robert L.M., 1985 a y b).

La evidente importancia económica de estas aplicaciones del CTV, permite explicar el creciente interés que sobre estas técnicas, se ha observado en los últimos años, permitiendo su rápido desarrollo. En nuestro país, se ha señalado como una área biotecnológica de particular interés, recomendándose el apoyo gubernamental y privado para la ejecución de proyectos, en los campos de preservación de germoplasma, biosíntesis de productos vegetales, micropropagación, investigación básica y mejoramiento genético (Quintero R., 1985).

En el campo del fitomejoramiento, el CTV ha permitido eliminar las barreras de la incompatibilidad interespecífica, logrando cruza entre individuos de diferentes especies y aún entre taxa superiores, mediante la hibridación somática por fusión de protoplastos (Power B.J., Cummins E.S. y Cocking C.E., 1970), o bien mediante el rescate de embriones (Stewart McD.J., 1981); por otra parte, ha permitido progresos importantes en el diseño genético dirigido de nuevos organismos, denominado

ingeniería genética, aprovechando las técnicas de DNA recombinante (Herrera E.L., et al, 1983) y por último, se han superado las limitaciones metodológicas, en costos y de tiempo empleado para la selección de variantes genéticos, mediante la selección in vitro, en contraste con el método convencional de selección masal (Widholm M.J., 1983).

La selección de variantes genéticos por métodos in vitro, o selección in vitro, aprovecha la variabilidad genética natural presente en las poblaciones celulares. Es bien conocido que, particularmente en el caso de las especies vegetales, se presentan genes mutables, esto es, que muestran un mayor grado de inestabilidad genética (Skirvin M.R., 1978), lo que trae como consecuencia que una característica específica, determinada por estos genes, presente gran variabilidad dentro de la población. Así mismo, se ha logrado observar la presencia de mapas genéticos, esto es, que dentro de un mismo organismo, se pueden presentar diferentes tipos genéticos entre sus componentes celulares, generalmente por cambios en la ploídia, lo cual está en relación con el tipo de tejido al que pertenezcan (Bayliss W.M., 1973; Chaleff S.R. y Keil L.R., 1981).

Esta amplia variabilidad genética natural, se mantiene o amplifica en el cultivo in vitro (Kibler R. y Neumann H., 1980; D'Amato F., et al, 1980), lo cual se ha atribuido a diversos factores como el tipo de explante empleado y número de subcultivos (Bayliss W.M., 1973), reguladores del crecimiento adicionados al medio de cultivo (Mohandas T. y Grant F.W., 1972) las condiciones de cultivo, si bien estas últimas son

consideradas más como agentes selectivos, que como inductoras de la inestabilidad genética.

Por otra parte, el cultivo in vitro permite así mismo, la aplicación de agentes mutagénicos físicos y químicos (Horsch B.R. y Jones E.G., 1980; Widholm M.J., 1984), para inducir la aparición de mutantes que presenten características fenotípicas que resulten de importancia agrícola o industrial.

Se tienen numerosos ejemplos de la selección in vitro para la obtención de líneas celulares resistentes o tolerantes a enfermedades por patógenos (Tomes T.D. y Swanson B.E., 1982), a herbicidas (Giffard S., Collin H. y Putwain P., 1982; Swanson B.E. y Tomes T.D., 1982), a análogos de aminoácidos (Widholm M.J., 1978), a metales (Ojima K. y Ohira K., 1982; Koo S.K.F., 1982), a enfriamiento (Chen W.H. et al, 1982), a sequía (López P.C., 1985) y a salinidad (Dix J.P. y Street E.H., 1975; Pandey R. y Ganapathy S.P., 1984) o bien para la obtención de mutantes fisiológicos (Carlson S.P., 1970). El material biológico obtenido de esta manera, ha permitido profundizar en la comprensión de los mecanismos genéticos, bioquímicos y fisiológicos, a nivel celular, involucrados en las respuestas fenotípicas observadas (López P.C., 1985), al poder emplearlos como modelo de estudio donde se eliminan todas aquellas respuestas que son producto de una organización estructural, con la especialización inherente a ésta, mostrada por las plantas completas y sólo se mantienen aquellas que tengan una base celular.

La estrategia empleada en la selección in vitro, de acuerdo a Tomes T.D. y Swanson B.E. (1982), involucra de manera general,

las siguientes etapas (Fig. 1):

- A) Preparación del material de cultivo in vitro apropiado
- B) Mutagénesis (opcional)
- C) Exposición al agente selectivo, en concentraciones letales o subletales, en este último caso, el material que muestre tolerancia será transferido secuencialmente a niveles más elevados del agente selectivo
- D) Aislamiento y subcultivo del material tolerante a medios de cultivo, en presencia y libre del agente selectivo
- E) Caracterización de líneas susceptibles y tolerantes posterior a una nueva aplicación del agente selectivo en los cultivos que crecieron, por cierto período de tiempo, en ausencia del agente selectivo
- F) Análisis de las bases celulares de la tolerancia
- G) Rediferenciación de plantas completas a partir de los cultivos tolerantes
- H) Exposición al agente selectivo de las plantas regeneradas, semillas provenientes de ellas y/o tejidos en cultivo in vitro, extraídos de plantas pertenecientes a la F1
- I) Análisis de las bases fisiológicas y bioquímicas de la tolerancia al nivel de la planta completa
- J) Estudio sobre la herencia de la característica de tolerancia
- K) Estudio de los posibles efectos del proceso de selección, sobre otros caracteres relacionados con el desarrollo, crecimiento, morfología y producción de las plantas tolerantes

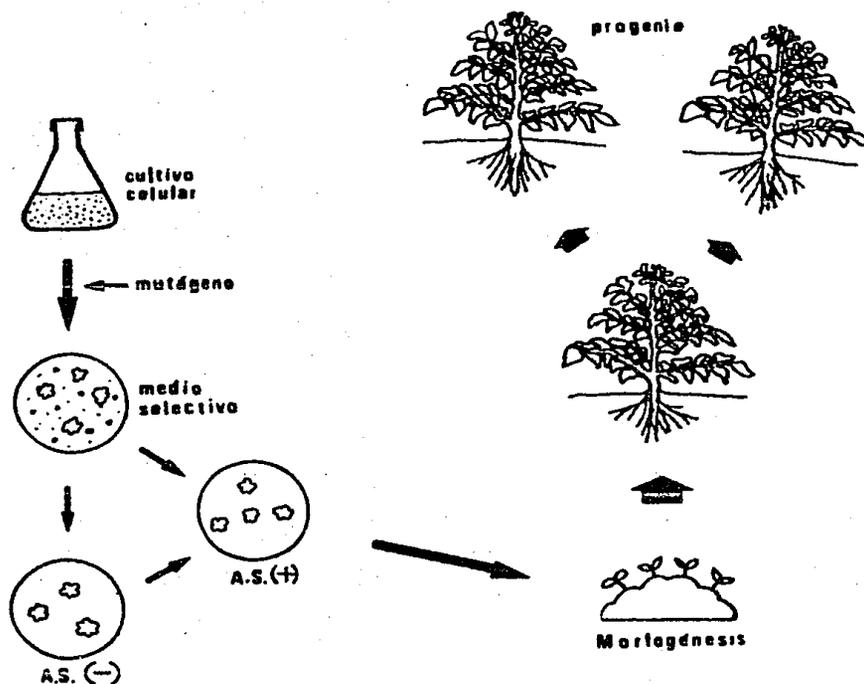


Figura 1. Estrategia general para la selección in vitro de variantes somaclonales y regeneración de plantas tolerantes a condiciones selectivas.

Para llevar a efecto las diversas etapas de la selección in vitro, es conveniente tomar en cuenta los siguientes aspectos: El tamaño y tipo de la unidad de selección, las condiciones de selección, la capacidad de morfogénesis en los cultivos celulares, la estabilidad genética y citológica del carácter y la

correlación entre la respuesta celular y la respuesta de la planta completa.

La unidad de selección, esto es la unidad biológica sobre la que, al aplicar el agente selectivo, mostrará la característica de tolerancia, expresada fenotípicamente como la capacidad de crecimiento en presencia del agente selectivo, consiste generalmente de células individuales, suspendidas en medio de cultivo, o bien de protoplastos, esto es, células vegetales desprovistas de pared celular; si bien, se llegan a emplear cultivos de callos, aunque no resulta recomendable, pues las primeras opciones son las más próximas a los eficientes sistemas de selección microbiológica (Tomes T.D. y Swanson B.E., 1982), reconociéndose un importante efecto de esta unidad de selección sobre el aislamiento de genotipos mutantes.

A partir de lo anterior, resulta evidente que la implementación del sistema de selección in vitro, se inicia con el establecimiento de los cultivos celulares bajo condiciones asépticas. La estrategia más común, es el establecimiento de cultivos de callos y a partir de estos, los cultivos de células en suspensión y su caracterización.

### 3.1 Cultivo de Callos

Uno de los tipos más comunes de CTV, es el cultivo de callos, que podríamos definir como masas de células vegetales con crecimiento activo, producto de la inducción de proliferación celular a partir de fragmentos o explantes de tejido proveniente

de una planta completa, bajo condiciones in vitro. El anterior concepto trata de generalizar las múltiples definiciones que al respecto se han empleado (Street E.H., 1977; Dodds H.J. y Roberts W.L., 1982; Mantell H.S., et al, 1985).

Aún cuando para la inducción de callos, generalmente se han empleado tejidos de angiospermas, tanto en dicotiledóneas como monocotiledóneas, se ha observado también en gimnospermas, pteridofitas y briofitas (Yeoman M.M. y Macleod J.A., 1977). Actualmente es posible decir que todos los organismos vegetales multicelulares, son fuentes potenciales de callos.

En esta misma dirección, respecto al tipo de tejido del cual provienen los explantes, se ha observado su inducción a partir del cambium vascular, parénquima, periciclo de la raíz, endospermo, cotiledones, mesófilo de hoja y tejido provascular (Yeoman M.M. y Macleod J.A., 1977), aunque actualmente se ha ampliado el número para incluir meristemas, polen, embriones, hipocotilo, etc.; (Hurtado M.D. y Merino M.M.E., 1987).

La inducción de callos, se lleva a cabo a través de varias etapas, iniciándose con la desinfección de los explantes, cuya finalidad es eliminar o remover todos los microorganismos contaminantes de la superficie del tejido o del material biológico que se empleará como fuente para la iniciación del cultivo, sin llegar a ser letal para el tejido vegetal.

Los ciclos de desinfección superficial del material biológico, se pueden dividir en tres etapas: En la primera, de predesinfección, se busca remover los contaminantes más superficiales, capas lipídicas y romper la tensión superficial,

para ello se emplean detergentes o alcoholes, entre estos últimos, el más empleado es el etanol al 70 % (v/v), concentración en la cual, muestra cierta actividad germicida (Davis D.B., et al, 1978).

En la segunda etapa, propiamente la desinfección, en la que se eliminaran todos los contaminantes, se emplean agentes químicos con actividad germicida; entre los más empleados, se encuentran el hipoclorito de calcio y el hipoclorito de sodio, cuya concentración y tiempo de exposición, que inciden en su efectividad, dependerán del grado de contaminación y de su toxicidad sobre el material biológico.

Finalmente, en la etapa de postdesinfección, se eliminan los restos del desinfectante ya sea mediante múltiples enjuagues con agua destilada estéril o previo a esto, en el caso de los hipocloritos, se emplea un tratamiento ácido, con HCl, para garantizar la destrucción del agente químico (Abdul-Baki A.A., 1974a). La desinfección superficial, se puede efectuar sobre la planta o tejidos de ésta pero, en los casos en que ésto es posible, resulta más conveniente practicarlo sobre semillas que serán germinadas en condiciones asépticas y por ende, las plántulas provenientes de éstas, se encontrarán libres de microorganismos contaminantes.

Una vez que el material no presenta contaminantes, se procede a extraer los explantes, mismos que serán colocados en un medio de cultivo y bajo condiciones de cultivo adecuadas para la inducción del callo. Entre los medios de cultivo, se tienen una gran variedad de ellos (Street E.H. y Shillito D.R., 1977), pero

básicamente presentan cuatro tipos de componentes, los constituyentes inorgánicos, esto es, el conjunto de elementos minerales esenciales para el crecimiento vegetal; los constituyentes orgánicos, tanto carbohidratos, aminoácidos y vitaminas, requeridos por las células vegetales, dado que en cultivo in vitro, se encontrarán en estado heterotrófico y por ende no será posible su biosíntesis (Ojima K. y Ohira K., 1978); los suplementos orgánicos de composición compleja, como el agua de coco, hidrolizados de proteínas, etc. que actualmente tienden a ser eliminados de los medios empleados en CTV y finalmente, los reguladores de crecimiento o fitoreguladores, principalmente auxinas y citocininas que juegan uno de los papeles más importantes en la inducción de los callos.

Actualmente, se reconoce la importancia de un balance exógeno de auxinas y citocininas en el medio de cultivo para el desarrollo de los eventos morfogénéticos a partir de los tejidos vegetales en cultivo in vitro (Murashige T., 1979). Si bien no es posible aún definir claramente la relación entre este balance y el tipo de respuesta morfogénica observada, en algunos casos se ha establecido que bajas concentraciones de auxina combinadas con altas concentraciones de citocinina favorecen la inducción de brotes adventicios; la relación contraria, favorece el proceso de rizogénesis y concentraciones equivalentes de ambos fitorreguladores estimulan el desarrollo de callos (Kantha K.K., 1982). Lo anterior no resulta de ninguna manera generalizable, pues dependerá de la especie, tipo de explante, tipo de fitorreguladores, condiciones de cultivo y particularmente del

balance endógeno de reguladores presente en el explante.

Los cultivos de callos, pueden ser mantenidos indefinidamente mediante subcultivos, esto es, transferencias del material celular a medio de cultivo fresco, mismas que se efectúan periódicamente, a fin de evitar la muerte del cultivo por falta de nutrientes y acumulación de toxinas (Yeoman M.M. y Macleod J.A., 1977).

### 3.2 Cultivo de células en suspensión

El cultivo en suspensión consiste de células vegetales libres o en pequeños agregados que crecen en un medio líquido, con agitación continua, empleándose tanto sistemas de cultivo batch como de cultivo continuo. Son establecidos usualmente, a partir de cultivos de callos previos (Street E.H., 1977), si bien es posible iniciarlos a partir de suspensiones de protoplastos o de explantes primarios (Dodds H.J. y Roberts W.L., 1982; Mantell H.S., et al, 1983).

Los requerimientos para su cultivo, son básicamente los mismos que aquellos empleados en el cultivo del callo del cual proceden, si bien en ocasiones se requiere de alguna modificación en el medio de cultivo. Particularmente en este caso, es necesario, mantener una adecuada agitación del cultivo a fin de evitar, en lo posible, la agregación celular (Rajasekhar W.E. et al, 1971).

El mantenimiento de los cultivos en suspensión se efectúa, al igual que en el caso de los callos, mediante subcultivos, en

los cuales es importante considerar la densidad mínima efectiva, esto es, el mínimo inóculo necesario con el cual, la nueva suspensión puede reproducir su crecimiento (Street E.H., 1977), en general esta densidad mínima efectiva se encuentra entre 1 y  $1.5 \times 10^5$  cels./ml.

Los cultivos en suspensión, permiten extender el empleo de las técnicas microbiológicas a los vegetales superiores, por ejemplo, en el caso del plaqueo, sobre cajas petri conteniendo medio de cultivo semisólido que, mediante la división de las células, permite el desarrollo de callos nuevamente.

### 3.3 Estimación del crecimiento en los cultivos celulares

La estimación del crecimiento de las poblaciones celulares mantenidas en cultivo in vitro, es la primera de las caracterizaciones necesarias en éstos, sin embargo, muestra serias dificultades dado que, en el caso de los cultivos de callos, resulta difícil la separación de las células que los constituyen, además de los problemas que existen para definir un volumen adecuado de callo, puesto que no siguen un patrón de crecimiento homogéneo. La alternativa ha sido emplear el criterio de peso fresco, lo que implica grandes riesgos de contaminación, además de que resulta discutible el uso de este parámetro pues puede sólo indicar un incremento en la masa celular, más que un incremento en el número de células. A pesar de lo anterior se han empleado modelos como la ecuación de Blackman:  $W = W_0 e^{kt}$ , para describir el crecimiento de los callos (Aitchison A.P., et al,

1977).

En el caso de los cultivos de células en suspensión, si bien el problema de la disgregación celular es posible resolverlo más fácilmente, resulta necesaria una adecuada selección de los diversos parámetros empleados en la estimación, pues podrán expresar tanto el crecimiento en el número de la población, como cambios en el metabolismo de las células en cultivo (Rose D. y Martin M.S., 1974). En general, los cultivos mantenidos en sistemas batch, son descritos por modelos semilogarítmicos, que permiten una adecuada descripción de las curvas de tipo sigmoide, característico de este sistema de cultivo (King J.P. y Street E.H., 1977).

La búsqueda de modelos matemáticos que describan el crecimiento de las poblaciones celulares tendrá como objetivo, proveer de estimadores que permitan una caracterización confiable de los cultivos y que a su vez, servirá para la contrastación entre diferentes líneas celulares.

#### 3.4 Análisis estadístico en el cultivo de tejidos

Un aspecto importante y relacionado con el anterior, lo constituye el empleo de métodos estadísticos que permitan efectuar afirmaciones sobre los resultados obtenidos en el cultivo in vitro, con cierta probabilidad de error. En este sentido, existen pocos casos en la literatura que empleen pruebas estadísticas en el análisis de sus resultados, debido por una parte a la dificultad para la selección de pruebas adecuadas y a

que en general, se han usado criterios subjetivos en la evaluación de resultados.

Hurtado y Merino (1987), incluyen un capítulo sobre métodos estadísticos empleados en el cultivo de tejidos, sin embargo, se hace un desproporcionado hincapie en las pruebas paramétricas que muestran una serie de limitaciones para su aplicación con evaluaciones subjetivas, para las cuales es más recomendable el uso de pruebas no paramétricas (Siegel S., 1972).

#### 4. Cultivo in vitro de Physalis ixocarpa

Actualmente en la literatura existen pocos reportes acerca del empleo de las técnicas de cultivo in vitro en el género Physalis, posiblemente debido a que el interés sobre su importancia, sobre todo farmacológica, es reciente.

En este sentido, se tienen por ejemplo el trabajo de Sipahimalani y colaboradores (1981), en el cual se contrasta el potencial biosintético de los callos y plantas regeneradas, de explantes de tallo de P. minima, para producir whitanolidas.

En el caso de P. ixocarpa, el único reporte, existente en la literatura, es el de Ramírez y coautores (1985), en el cual se define tipo, concentración y combinación más adecuada de reguladores de crecimiento, para la inducción de brotes y raíces, a partir de explantes de hipocotilo, resultando óptimo para la formación de brotes, el empleo de ácido  $\alpha$ -Naftalenacético 1-12.5  $\mu\text{M}$  en combinación con 6-Bencilaminopurina (BAP) 12.5-50  $\mu\text{M}$ . Mientras que la inducción de raíces, fue más frecuente en la

misma concentración de ac. naftalenacético, en combinación con 0-1  $\mu$ M de BAP.

Por comunicación personal con el Dr. Naftalí Ochoa A. (CINVESTAV, Unidad Irapuato), en el mismo trabajo, se observó que el empleo de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético estimulaba la formación de callos, en contraste con otras auxinas experimentadas.

De lo anterior se desprende, que aún cuando hay algunos avances en el empleo de las técnicas de cultivo de tejidos, éstas aún deberán ser adecuadas y optimizadas, particularmente para el caso de los cultivos de callos y de células en suspensión, que permitirá a su vez el empleo de métodos in vitro, en el mejoramiento de la especie, interés del presente trabajo.

## OBJETIVOS

En el presente trabajo se planteó como objetivo a corto plazo, la adaptación de la metodología para el establecimiento de cultivos celulares in vitro de Physalis ixocarpa var. Rendidora, que comprendió:

- Definir el balance óptimo de auxinas y citocininas, más adecuado para la inducción de callos.
- Definir el tipo de explante, folíolos o hipocotilo, más adecuado para la inducción de callos.
- Establecer un modelo matemático apropiado para describir la cinética de inducción de callos.
- Establecer el cultivo de células en suspensión a partir de los callos obtenidos.
- Determinar la cinética de crecimiento del cultivo en suspensión.
- Estimar la capacidad máxima del mismo y el período de subcultivo.

Lo anterior, permitirá abordar objetivos a mediano plazo que consisten en la selección in vitro y caracterización de líneas celulares que muestren tolerancia a las condiciones presentes en suelos salinos con complejo cálcico, característicos de la zona chinampera de Xochimilco.

A largo plazo, el material biológico y la información obtenida, podrá ser empleada en el fitomejoramiento de la especie, ya sea mediante los métodos convencionales o con las alternativas que en esta área ofrecen los métodos in vitro.

## MATERIAL Y METODOS

### 1. OBTENCION DEL MATERIAL BIOLOGICO

#### 1.1 Desinfección superficial de semillas.

Se utilizaron semillas de tomatillo var. Rendidora (PRONASE), las cuales fueron desinfectadas superficialmente mediante el siguiente procedimiento: Inicialmente se lavaron con agua destilada y se colocaron durante 30 segundos en etanol al 70% (v/v), el cual fue decantado y las semillas suspendidas en hipoclorito de calcio al 10% (p/v) durante 5 min después de los cuales, se les aplicó un tratamiento con ácido clorhídrico 0.1 M durante 60 seg a fin de eliminar las trazas del hipoclorito. Finalmente, las semillas fueron enjuagadas en cinco ocasiones con agua destilada estéril.

#### 1.2 Obtención de plántulas y extracción de explantes.

Una vez desinfectadas, se sembraron diez semillas en cada frasco de cultivo, conteniendo 20 ml de agar bacteriológico (Bioxon) al 1% (p/v) con pH 5.8, previamente esterilizado en autoclave, con las mismas condiciones de esterilización que se emplearon en la preparación de los medios de cultivo (apéndice A). Así mismo, al igual que todas las manipulaciones que requirieron de efectuarse en condiciones de asepsia, la desinfección y siembra de las semillas se realizó dentro de una

campana de flujo laminar (VECO).

Los frascos conteniendo las semillas, se colocaron en una incubadora a 26°C y oscuridad constante durante cinco días y posteriormente, durante otros cinco días, bajo iluminación continua (1000 lx). Después de este período, las plántulas contaban con 4-6 cm de longitud en su porción aérea y fué entonces cuando se procedió a extraer los explantes de folíolo, con 2-3 mm de longitud, en cortes perpendiculares a la nervadura principal; y de hipocotilo, con 3-4 mm de longitud.

Previamente, se determinó la cinética de germinación de las semillas de tomatillo, para lo cual se sembraron 70 semillas desinfectadas superficialmente en cada una de cinco cajas de petri de 20x100 mm conteniendo 2 círculos de papel filtro Whatman no. 1, embebidos con 5 ml de agua destilada estéril, finalmente se sellaron con plástico autoadherible.

Posteriormente se colocaron a 26°C en oscuridad continua y se efectuaron determinaciones del porcentaje de germinación por caja a las 22, 44, 66, 74, 88, 93, 110 y 123 hrs., empleando como criterio para la germinación, la emergencia de la radícula. El valor promedio para cada determinación se obtuvo a partir de los valores arcoseno para el porcentaje obtenido en cada caja.

## 2. CULTIVO DE CALLOS

Ambos explantes fueron contrastados en los medios de cultivo que fueron utilizados para establecer el rango de concentraciones del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y de la

6-bencilaminopurina (BAP), en las cuales se encontraba el balance óptimo de auxina y citocinina para la inducción de los callos.

Para ello, se efectuaron dos pruebas preliminares.

### 2.1 Prueba preliminar I

En esta prueba, se emplearon cinco repeticiones para cada tipo de explante, en cada uno de los medios de cultivo indicados en el Cuadro 1; que consistían en frascos de cultivo conteniendo 10 ml de medio basal Murashige-Skoog, cuya preparación se describe en el Apéndice A, adicionado con diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP (Cuadro 1), agar noble (Difco) al 1% (p/v) y pH 5.8.

Cuadro 1. Concentración de 2,4-D, BAP y nomenclatura utilizada en la prueba preliminar I.

MEDIO	2,4-D (M)	BAP (M)
DOB0	0.0	0.0
D6B0	$1 \times 10^{-6}$	0.0
DOB6	0.0	$1 \times 10^6$
D7B8	$1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^8$
D6B8	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^8$
D5B8	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^8$
D7B7	$1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^7$
D6B7	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^7$
D5B7	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^7$
D7B6	$1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^6$
D6B6	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^6$
D5B6	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^6$
D7B5	$1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^5$
D6B5	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^5$
DSB5	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^5$

Se sembraron cuatro explantes de folíolo o hipocotilo, según fuera el caso, en cada frasco de cultivo. La siembra se efectuó bajo condiciones asépticas y posteriormente fueron colocados en incubación a 26°C en la obscuridad, durante 38 días, al final de los cuales, se determinó el porcentaje de inducción de callo en cada repetición. Así mismo, se obtuvo el promedio para cada grupo experimentado, transformando previamente los porcentajes a su correspondiente valor arcoseno, esto es:

$$\text{sen}^{-1} \sqrt{x}$$

donde  $x$  = decimal del porcentaje

Para el análisis estadístico de los efectos de las combinaciones de 2,4-D y BAP, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis (Apéndice B) y la prueba de comparación múltiple (Apéndice C). En el análisis de las posibles diferencias entre los dos tipos de explante, se empleó la prueba U de Mann-Whitney (Apéndice D).

## 2.2 Prueba preliminar II

A partir de los resultados obtenidos y empleando las mismas condiciones de cultivo, tipo de explante y medio basal; en la prueba preliminar II se incrementó a diez el número de repeticiones por tipo de explante en cada uno de los medios indicados en el Cuadro 2. En este caso, la determinación de los porcentajes de inducción de callo, se efectuó a los 40 días de

cultivo y su análisis estadístico se realizó empleando las mismas pruebas del caso anterior.

Cuadro 2. Concentración de 2,4-D, BAP y nomenclatura utilizada en la prueba preliminar II.

MEDIO	2,4-D (M)	BAP (N)
DOB0	0.0	0.0
D6B8	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^8$
D5B8	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^8$
D4B8	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^8$
D6B7	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$
D5B7	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$
D4B7	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^7$
D6B6	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^6$
D5B6	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^6$
D4B6	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^6$

### 2.3 Prueba final

En esta prueba, donde se definió el balance óptimo de concentraciones para la inducción de callo, se emplearon las mismas condiciones de cultivo, tipo de explante, medio basal y número de repeticiones, en los medios de cultivo indicados en el Cuadro 3.

En la evaluación, efectuada a los 40 días de cultivo, se determinó el porcentaje de rizogénesis, además del porcentaje de inducción de callo y se utilizaron los criterios morfológicos como consistencia, textura y pigmentación para evaluar las características macroscópicas del callo obtenido.

Cuadro 3. Concentración de 2,4-D, BAP y nomenclatura utilizada en la prueba final.

MEDIO	2,4-D (M)	BAP (M)
DOBO	0.0	0.0
D6B8	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-8}$
D5B8	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-8}$
D6B7	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-7}$
D5B7	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-7}$
D6B6	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$
D5B6	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-6}$

Así mismo, a partir de los 16 días de cultivo, se determinó el porcentaje de inducción periódicamente a fin de establecer la cinética de inducción y con ello, estimar la velocidad y el tiempo máximo de inducción de callo.

Para establecer la cinética de inducción de callo, se empleó el ajuste al modelo logístico de crecimiento, definido por la función:

$$Y = b e^{m/x}$$

donde b y m son la ordenada al origen y la pendiente, respectivamente, obtenidas de la regresión lineal efectuada con los valores promedio del porcentaje de inducción (Y) para el día (X) correspondiente al período de cultivo.

La estimación del porcentaje máximo de inducción, se efectuó empleando la transformación Walford (Apéndice E) con los valores promedio de los porcentajes de inducción obtenidos entre los 20 y 40 días de cultivo. Mientras que el tiempo máximo de inducción se

estimó a partir de la función lineal de la cinética de inducción.

### 3. CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION

#### 3.1 Establecimiento del cultivo en suspensión

A partir de los resultados en la etapa previa, no fue posible encontrar diferencias entre los dos tipos de explante, por lo cual los callos obtenidos de folíolo e hipocotilo, fueron subcultivados en los medios óptimos D5B6 y D6B8 respectivamente.

De esta manera, para iniciar los cultivos en suspensión, se emplearon los medios de cultivo, D5B6 y D6B8, líquidos y distribuidos en alícuotas de 25 ml en matraces Erlenmeyer de 125 ml, cerrados con papel aluminio y esterilizados previamente en autoclave (apéndice A).

En una primera etapa, se emplearon callos con 16 días de edad, de folíolo e hipocotilo, mismos que fueron fragmentados para colocar aproximadamente  $0.5 \text{ cm}^3$  de células en cada matraz de cultivo, efectuando las manipulaciones bajo condiciones asépticas. Los cultivos se colocaron en incubación a  $26^\circ\text{C}$  y oscuridad continua, dentro de un baño con agitación a 120 rpm.

Después de 25 días, los cultivos de folíolo mostraban, claramente, el desarrollo de raíces a partir de pequeños agregados, por lo cual se procedió a efectuar la transferencia de los cultivos en suspensión de hipocotilo, para lo cual se filtró el cultivo a través de una malla de acero inoxidable con poro de

184  $\mu\text{m}$  de diámetro, a fin de eliminar los grandes agregados celulares y fragmentos del callo empleado en su establecimiento. Se inocularon 5 ml del filtrado por cada matraz de cultivo, con 25 ml de medio fresco D6B9; los cuales se colocaron bajo las mismas condiciones de cultivo, descritas anteriormente.

### 3.2 Determinación del crecimiento.

Durante el período que duró este subcultivo, 25 días, se determinó la cinética de crecimiento en base al número de células por unidad de volumen de la suspensión. Para ello, se efectuó el conteo de células en una cámara de Neubauer al microscopio de contraste de fases y por extrapolación, se determinó el número de células por ml de la suspensión, se efectuaron tres repeticiones para cada punto.

Se empleó nuevamente un modelo logístico, para describir la cinética, así como la transformación Walford, para la estimación de la capacidad de carga máxima del medio de cultivo y, por sustitución de ésta en el modelo, se estimó el tiempo de subcultivo.

## 4. METODOS DE ANALISIS MICROSCOPICO.

Para el análisis microscópico, tanto de los callos obtenidos como del cultivo en suspensión, se emplearon preparaciones frescas de los mismos. En el caso de los callos, consistieron de parte de la proliferación celular, disgregándola suavemente sobre

el portaobjetos, con la ayuda de agujas de disección, antes de colocar el cubreobjetos.

En el caso de los cultivos en suspensión, se tomaron muestras de los mismos con una pipeta Pasteur y se colocaron entre portaobjetos y cubreobjetos. Básicamente se efectuaron observaciones de las características de pared celular, núcleo y vacuolas, que permitieran definir el tipo celular; así mismo, se realizaron observaciones sobre la forma y longitud máxima de las células.

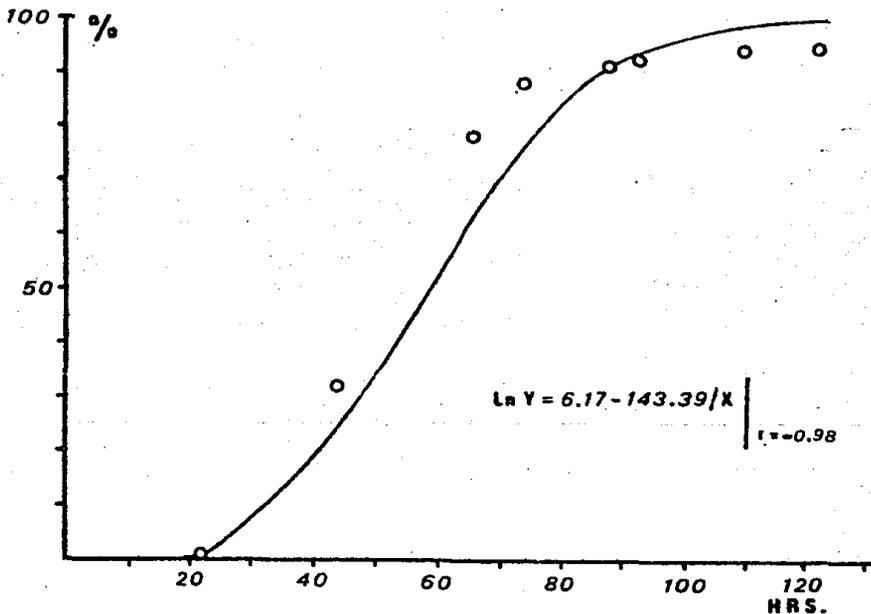
Para el análisis se empleó generalmente un microscopio de contraste de fases (Carl Zeiss), y en algunos casos, se empleó azul de toluidina al 0.05 % y lugol, para observaciones en campo claro y lograr la contrastación del citoplasma en contraste de fases.

## RESULTADOS

### 1. Germinación de semillas

A partir de la cinética de germinación de semillas (gráfica 1), es posible observar que después de 22 hrs, ésta se incrementa rápidamente hasta las 72 hrs, donde la velocidad disminuye.

Después de 5 días, las plántulas presentaban una altura de 2-3 cm sin desplegar los folíolos, lo cual se conseguía al colocarlas bajo iluminación constante durante cinco días más.



Gráfica 1. Cinética de germinación de semillas de *Physalis ixocarpa* Brot. Var. Rendidora

En la gráfica, aparece la función lineal que describe la

cinética de germinación, obtenida a partir del ajuste de los datos experimentales a un modelo logístico, así como la curva teórica resultante. Del análisis de varianza practicado para el coeficiente de correlación (Apéndice E), se tiene la siguiente tabla anova, que muestra una alta significatividad estadística para el coeficiente de correlación.

TABLA ANOVA

F.V.	g.l.	S.C.	C.M.	F
Total	7	22.9274		
Regresión	1	22.0023	22.0023	142.71
Desviación	6	0.9251	0.1542	

Empleando el método de Walford (Apéndice F), se estimó como porcentaje de inducción máximo 93.95 %, el cual se alcanzaba después de 88 hrs de incubación.

## 2. Cultivo de callos

A partir de las observaciones hechas durante el proceso de inducción de callos en las tres pruebas efectuadas, es posible establecer un patrón general, en el cual los explantes que mostraron respuesta, incrementaban su longitud durante los primeros cinco días de cultivo, en el caso de los explantes foliares, este incremento era acompañado de un aumento gradual de zonas cloróticas, con pérdida de pigmentación, que iniciaba a partir de los extremos de corte y posteriormente se extendían sobre la nervadura central.

Después de una semana de cultivo, se observa el inicio de proliferación celular en los extremos de corte en explantes

foliares y en el caso de los explantes de hipocotilo, un incremento en el volumen de la región central. El inicio de la proliferación en los explantes de hipocotilo se presenta después de los diez o doce días de cultivo.

A fin de contar con un criterio para la formación de callos, se estableció considerar su presencia cuando la proliferación celular presentara un diámetro aproximado de 3 a 4 mm. Empleando este criterio, la formación de callos se observó a partir de dos semanas de cultivo, para algunos grupos, en el caso de los explantes foliares; en los explantes de hipocotilo se presentaban uno o dos días después.

La formación de raíces, mostrada particularmente por los explantes de hipocotilo, daba comienzo entre los 12 y 14 días de cultivo aún en el grupo testigo (DOBO), en el caso de los explantes foliares, se presentaba rizogénesis en aquellos grupos en los cuales se emplean altas concentraciones de 2,4-D y bajas concentraciones de BAP.

Los resultados mostrados a continuación, corresponden al promedio de los porcentajes de inducción para cada grupo o combinación de reguladores de crecimiento en las tres pruebas efectuadas para establecer el balance óptimo de 2,4-D y BAP, para cada tipo de explante. Así mismo se indica la suma de rangos de Kruskal-Wallis y el nivel de significación (N.S.), en base a la prueba de comparación múltiple. La separación de grupos de concentraciones con diferencias significativas entre sí, se indica empleando letras minúsculas, de tal manera que aquellos medios entre los que no hay diferencia significativa, aparecen

con la misma letra.

## 2.1 Prueba preliminar I

Tabla 1. Porcentaje de inducción de callo en la prueba preliminar I. Empleando explantes foliares, a los 38 días de cultivo.

GRUPO	REPETICIONES					MEDIA
	1	2	3	4	5	
D0B0	0	0	0	0	0	0.0
D6B0	0	25	25	25	0	9.55
D0B4	0	0	0	0	0	0.0
D7B8	0	0	0	0	0	0.0
D7B7	0	0	0	0	0	0.0
D7B6	0	0	0	0	0	0.0
D7B5	25	0	0	0	0	1.09
D4B8	0	100	75	0	100	55.23
D6B7	100	0	75	100	100	83.46
D4B6	100	50	0	100	0	50.0
D4B5	25	50	100	0	0	29.66
D5B8	25	75	75	100	100	83.46
D5B7	50	100	100	100	100	97.55
D5B6	75	75	100	100	25	83.46
D5B5	0	0	0	25	0	1.09

Tabla 2. Suma de rangos para los porcentajes de inducción de callo en la prueba preliminar I. En explantes de folíolo.

GRUPO	Porcentaje	Rango	N.S.*
D5B7	97.55	322.0	a
D5B8	83.46	294.5	a
D5B6	83.46	294.5	a
D6B7	83.46	280.5	ab
D6B8	55.23	234.5	bc
D6B6	50.00	230.0	c
D6B5	29.66	209.0	cd
D6B0	9.55	182.5	d
D7B5	1.09	132.5	e
D5B5	1.09	132.5	e
D0B6	0.00	107.5	e
D7B8	0.00	107.5	e
D7B7	0.00	107.5	e
D7B6	0.00	107.5	e
D0B0	0.00	107.5	e

\*  $p < 0.05$

Tabla 3. Porcentaje de inducción de callo en la prueba preliminar I. Empleando explantes de hipocotilo, a los 38 días de cultivo.

GRUPO	REPETICIONES					MEDIA
	1	2	3	4	5	
D0B0	0	0	0	0	0	0.0
D6B0	0	0	0	0	0	0.0
D0B6	0	0	0	0	0	0.0
D7B8	0	0	0	0	0	0.0
D7B7	0	0	0	0	25	1.09
D7B6	0	25	0	25	25	9.55
D7B5	0	0	0	0	0	0.0
D6B8	50	75	0	25	50	34.55
D6B7	0	75	25	100	0	34.55
D6B6	25	50	0	75	25	29.66
D6B5	0	50	50	0	25	16.54
D5B8	0	0	0	0	25	1.09
D5B7	25	50	100	0	50	44.77
D5B6	25	0	50	25	75	29.66
D5B5	0	75	0	25	0	9.55

Tabla 4. Suma de rangos para los porcentajes de inducción de callo en la prueba preliminar I. En explantes de hipocotilo.

GRUPO	PORCIENTO	Rango	N.S.*
D5B7	44.77	280.5	a
D6B8	34.55	277.0	a
D6B6	29.66	266.0	ab
D5B6	29.66	266.0	ab
D6B7	34.55	246.0	abc
D6B5	29.66	229.5	bcd
D7B6	9.55	207.5	cd
D5B5	9.55	195.0	d
D5B8	1.09	147.5	e
D7B7	1.09	147.5	e
D6B0	0.00	117.5	e
D0B6	0.00	117.5	e
D7B8	0.00	117.5	e
D7B5	0.00	117.5	e
D0B0	0.00	117.5	e

\*  $p < 0.05$

## 2.2 Prueba Preliminar II

Tabla 5. Porcentaje de inducción de callo en la prueba preliminar II. Empleando explantes foliares a los 40 días de cultivo.

GRUPO	REPETICIONES										MEDIA
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
D0B0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
D6B9	75	50	50	75	0	0	50	25	50	0	29.66
D6B7	50	50	25	25	75	0	25	100	0	0	29.66
D6B6	0	0	75	25	0	0	75	25	0	0	9.55
D5B8	0	0	0	50	0	75	25	75	50	0	16.54
D5B7	25	25	50	25	75	0	0	0	100	25	27.30
D5B6	0	0	50	100	100	0	0	0	25	100	32.08
D4B8	50	25	0	0	50	25	0	50	0	0	11.14
D4B7	0	0	25	0	50	25	0	0	0	25	5.45
D4B6	0	0	0	0	0	75	0	0	0	0	1.09





Tabla 10. Suma de rangos para los porcentajes de inducción de callo en la prueba final. Empleando explantes de foliolo.

GRUPO	PORCIENTO	Rango	N.S.*
D5B6	99.73	617.0	a
D5B7	88.84	507.5	b
D6B6	62.94	344.5	c
D6B8	57.82	344.5	c
D6B7	57.82	344.5	c
D5B8	47.98	287.0	d
D0B0	0.00	60.0	e

\*  $p < 0.05$

Tabla 11. Porcentaje de inducción de callo en la prueba final. Empleando explantes de hipocotilo a los 40 días de cultivo.

GRUPO	REPETICIONES										MEDIA
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
D0B0	0	0	50	0	0	25	0	0	0	0	1.70
D6B8	75	100	100	50	75	100	100	100	100	100	94.68
D6B7	75	50	75	75	75	75	75	75	100	75	77.23
D6B6	75	100	50	75	100	100	75	50	100	50	85.36
D5B8	0	25	25	50	75	25	75	25	50	0	29.66
D5B7	50	75	0	50	0	50	75	25	0	75	32.03
D5B6	50	100	0	50	100	100	75	100	75	100	83.46

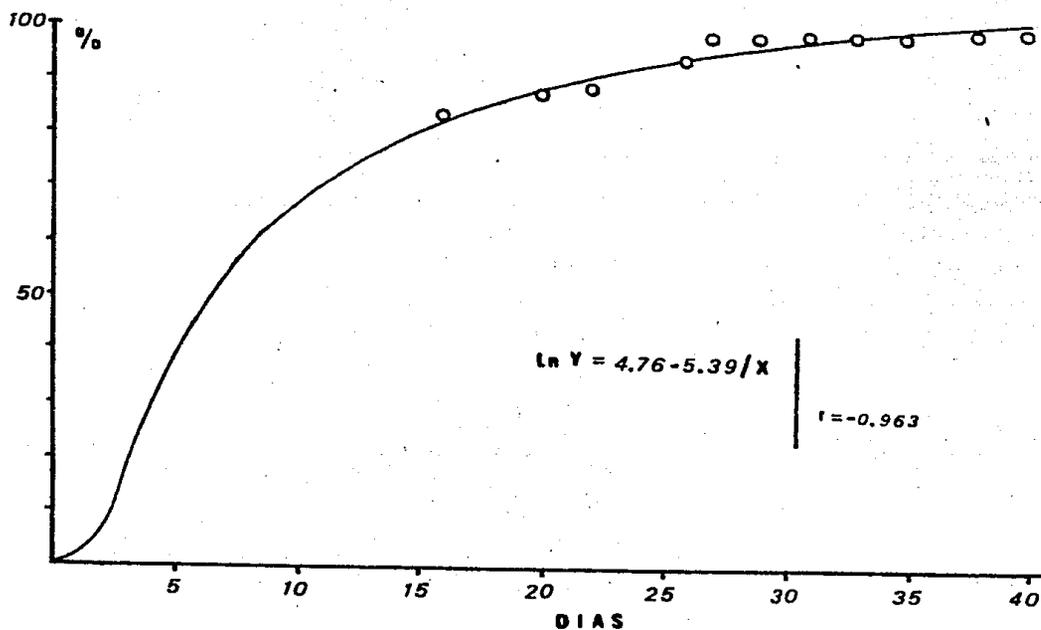
Tabla 12. Suma de rangos para los porcentajes de inducción de callo en la prueba final. Empleando explantes de hipocotilo.

GRUPO	PORCIENTO	Rango	N.S.*
D6B8	94.68	548.0	a
D6B6	85.36	459.5	b
D5B6	83.46	458.5	b
D6B7	77.23	437.0	b
D5B7	32.08	251.5	c
D5B8	29.66	226.0	c
DOB0	1.70	104.5	d

\*  $p < 0.05$ .

En las tres pruebas, se emplearon los promedios del porcentaje para cada tratamiento en la prueba U de Mann-Whitney, a fin de establecer si las diferencias entre los dos tipos de explante no se podían atribuir al azar, en todos los casos, no hubo diferencias significativas estadísticamente ( $p > 0.05$ ).

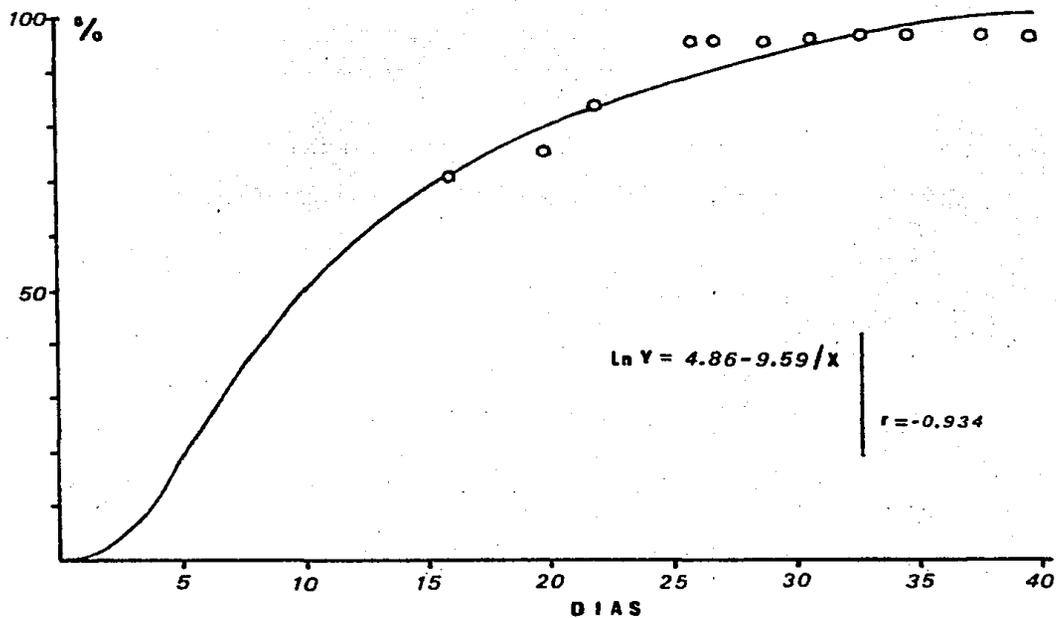
Por otra parte, en la prueba final de inducción de callos, se determinó periódicamente el promedio del porcentaje de inducción de callo, durante el período comprendido entre los 16 y 40 días de cultivo. Los datos obtenidos, para los medios D5B6 y D6B8, fueron ajustados al modelo de crecimiento logístico, cuya ecuación linearizada así como la curva experimental y la curva teórica, son mostradas en la gráfica 2 para el medio D5B6, que resultó óptimo para explantes de folíolo y en la gráfica 3 para el medio D6B8, que resultó óptimo para explantes de hipocotilo.



GRAFICA 2. -- Curva de inducción de callos a partir de explantes foliares en medio DSB6.

TABLA ANOVA

F.V.	g.l.	S.C.	C.N.	F
Total	10	0.0406		
Regresión	1	0.0377	0.0377	114.5
Desviación	9	0.00296	0.00033	



GRAFICA 3. Curva de inducción de callos a partir de explantes de hipocotilo en medio D&B8.

TABLA ANOVA

F.V.	g.l.	S.C.	C.M.	F
Total	10	0.1364		
Regresión	1	0.1190	0.1190	61.59
Desviación	9	0.0174	0.00193	

Posteriormente, se empleó la transformación Walford (Apéndice F), a fin de estimar el porcentaje máximo de inducción de callo, con lo cual se obtuvo, para el caso de los explantes foliares en medio D5B6, un porcentaje máximo de 99.71 %, el cual se alcanzaba a los 35 días, de acuerdo a la ecuación que describe la cinética (Gráfica 2).

En el caso de los explantes de hipocotilo, en medio D6B8, se obtuvo un porcentaje máximo de 96.79 % que se alcanzaba, de acuerdo a la función correspondiente (Gráfica 3), a los 33 días de cultivo. Se emplearon los valores del promedio de los porcentajes de inducción, obtenidos a partir de los 20 días, considerando que dichos puntos son posteriores al punto de inflexión de la curva correspondiente.

Así mismo, en esta prueba final de inducción de callos, se obtuvo el porcentaje de inducción de raíces en cada tratamiento, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), a partir de la aplicación de las pruebas de Kruskal-Wallis y comparación múltiple, cuyos resultados aparecen en las siguientes tablas.

Tabla 13. Porcentaje de rizogénesis en la prueba final. Empleando explantes foliares a los 40 días de cultivo.

GRUPO	REPETICIONES										MEDIA
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
D0B0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0.27
D6B8	75	0	100	75	75	75	25	100	75	50	67.92
D6B7	50	0	50	50	50	0	0	0	0	100	20.61
D6B6	25	50	0	0	0	50	0	0	0	0	4.32
D5B8	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0.27
D5B7	100	25	0	0	25	25	0	0	0	0	9.55
D5B6	0	50	0	50	50	50	50	0	0	25	18.53



Tabla 16. Suma de rangos para los porcentajes de rizogénesis, a partir de explantes de hipocotilo.

GRUPO	PORCIENTO	Rango	N.S.*
DOBO	70.34	614.0	a
D6B8	32.08	448.5	b
D6B7	16.54	398.0	c
D6B6	8.07	344.5	d
D5B8	0.27	235.0	e
D5B7	0.27	235.0	e
D5B6	0.0	210.0	e

\*  $p < 0.05$

Al final del período de cultivo, en la prueba final, se evaluaron las características de pigmentación, textura y consistencia, de los callos obtenidos en cada medio de cultivo, para explantes de folíolo e hipocotilo, cuyos porcentajes aparecen en las siguientes tablas

#### CLAVE

##### TEXTURA

G : Granular  
P : Porosa

##### CONSISTENCIA

F : Friable  
C : Compacto

##### PIGMENTACION

H : Hialino  
B : Blanco  
V : Verde  
C : Café  
R : Rojizo

Tabla 17. Características morfológicas del callo inducido, en los explantes foliares.

GRUPO	TEXTURA		CONSISTENCIA			PIGMENTACION			
	G	P	F	C	H	B	V	C	R
DOB0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
D6B8	69.6	30.4	69.6	30.4	30.4	0.0	0.0	69.6	0.0
D6B7	91.3	8.7	91.3	8.7	30.4	8.7	4.4	47.8	8.7
D6B6	50.0	50.0	50.0	50.0	0.0	50.0	8.3	12.5	29.2
D5B8	90.0	10.0	90.0	10.0	20.0	0.0	40.0	40.0	0.0
D5B7	42.4	57.6	42.4	57.6	12.1	15.2	27.3	36.4	9.1
D5B6	100	0.0	100	0.0	10.3	0.0	0.0	61.5	28.2

Tabla 18. Características morfológicas del callo inducido, en los explantes de hipocotilo.

GRUPO	TEXTURA		CONSISTENCIA			PIGMENTACION			
	G	P	F	C	H	B	V	C	R
DOB0	100	0.0	100	0.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0
D6B8	97.2	2.8	97.2	2.8	80.6	2.8	0.0	13.9	2.8
D6B7	100	0.0	100	0.0	36.7	0.0	0.0	33.3	30.0
D6B6	38.7	61.3	38.7	61.3	3.2	45.2	0.0	6.3	45.2
D5B8	100	0.0	100	0.0	50.0	50.0	0.0	0.0	0.0
D5B7	81.3	18.7	62.5	37.5	0.0	6.3	0.0	81.2	12.5
D5B6	83.3	16.7	83.3	16.7	26.7	13.3	13.3	46.7	0.0

### 3. Cultivo de células en suspensión

Hasta esta etapa no se establecieron diferencias entre los cultivos de callos inducidos a partir de explantes foliares y de hipocotilo. Sin embargo, después de 25 días en sus respectivos cultivos en suspensión, se observó que en el caso de los cultivos provenientes de callos de folíolo, se presentaba una mayor agregación celular, acompañada de la formación de raíces en los agregados (Foto 1), a diferencia de los cultivos provenientes de callo de hipocotilo, donde si bien existen agregados de 2 a más de 10 células, existe una gran cantidad de células libres y no hay indicios de alguna respuesta morfogénica, hacia la rizogénesis (Foto 2 y 3).

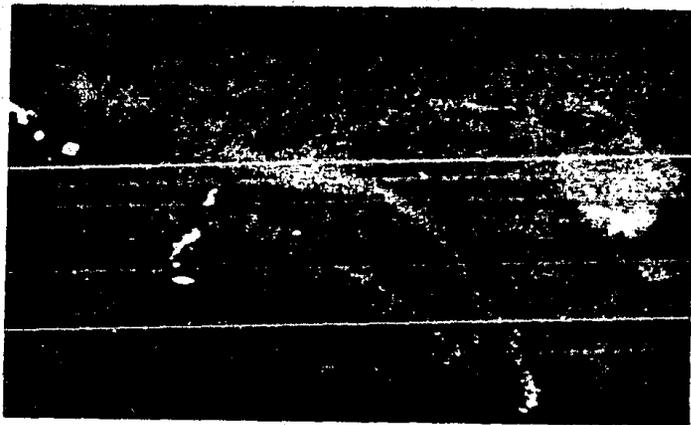


FOTO 1. Agregados en cultivos celulares provenientes de explantes foliares, mostrando rizogénesis. N.S.3.

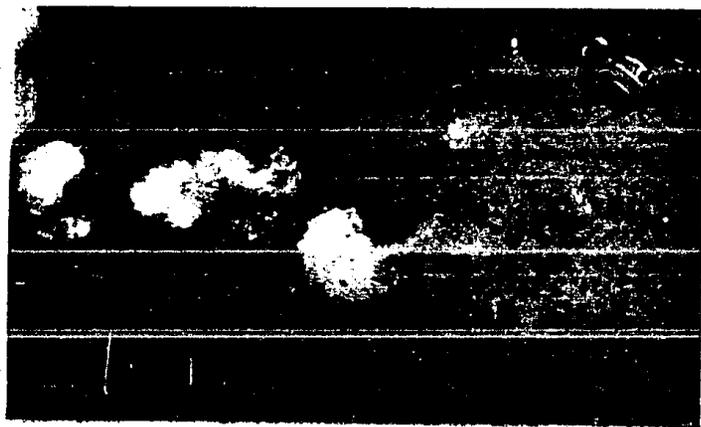


FOTO 2. Agregados en cultivos celulares provenientes de explantes de hipocotilo.  $\times 6.8$

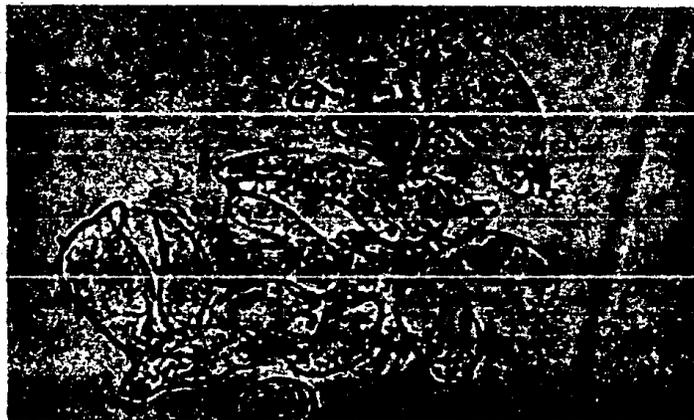
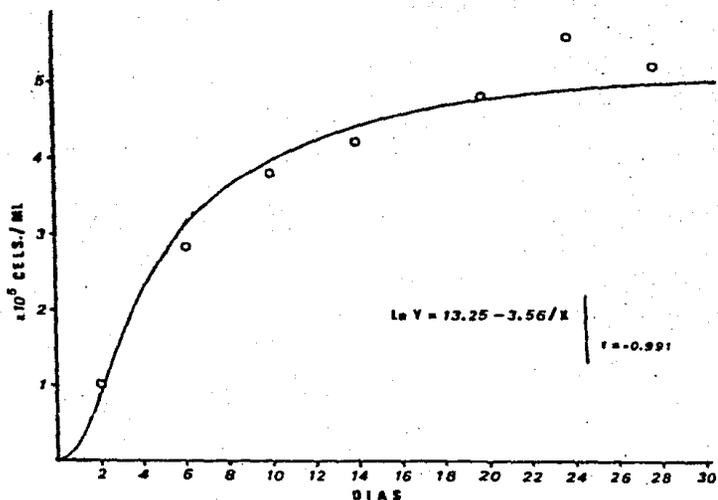


FOTO 3. Pequeños agregados celulares de los cultivos en suspensión provenientes de explantes de hipocotilo.  $\times 100$

Por esta razón, se decidió continuar manteniendo el cultivo en suspensión proveniente de callos inducidos a partir de hipocotilo, en medio D6B8.

Así mismo, se determinó la cinética de crecimiento, la cuál fué ajustada a un modelo logístico, cuya curva teórica aparece en la siguiente gráfica.



GRAFICA 4. Cinética de crecimiento en los cultivos en suspensión de células de hipocotilo en medio D6B8

TABLA ANOVA

F.V.	g.l.	S.C.	C.M.	F
Total	6	2.1365		
Regresión	1	2.096	2.096	253.74
Desviación	5	0.0405	0.0081	

Empleando el método de Walford, se calculó la capacidad de carga máxima del medio que resultó de  $4.747015 \times 10^5$  cels/ml y finalmente, se estimó el tiempo de subcultivo o tiempo en que se alcanza la capacidad máxima, mediante la sustitución de ésta, en el modelo empleado para describir la cinética de crecimiento, correspondiendo a 19 días de cultivo.

#### 4. Análisis microscópico

En el cultivo en suspensión, proveniente de explantes de hipocotilo, se observó la presencia de un gran número de células libres, si bien existen agregados de 2 o más células (Foto 3). En general, la forma celular era irregular aunque se presentaban células relativamente isodiamétricas, la longitud máxima variaba entre 12 y 93  $\mu\text{m}$ , para diferentes formas celulares. Resultó evidente la presencia de células conteniendo un gran número de plastidios, los cuales almacenaban almidón como producto de reserva, según se verificó mediante su tinción con lugol (Foto 4 y 5), en ocasiones estos plastidios se localizaban en la periferia del núcleo. Así mismo, se observaron fibras citoplásmicas transvacuolares.

En los callos inducidos, a partir de explantes de hipocotilo, se observó la presencia de células de tipo parenquimatoso (Foto 6), que mostraban al citoplasma y núcleo localizados en la periferia de una gran vacuola central. Tratando de hacer inferencias sobre el origen de la proliferación, se observó que en los extremos, de los explantes de hipocotilo, las

células proliferaban principalmente, a partir del parénquima, sin embargo se presentaban aún sobre la epidermis del explante (Foto 7). Así mismo fué posible observar en los callos, restos de células vasculares como traqueidas (Foto 8).



FOTO 4. Agregados celulares teñidos con lugol que muestra la distribución de los plastidios conteniendo almidón. x100

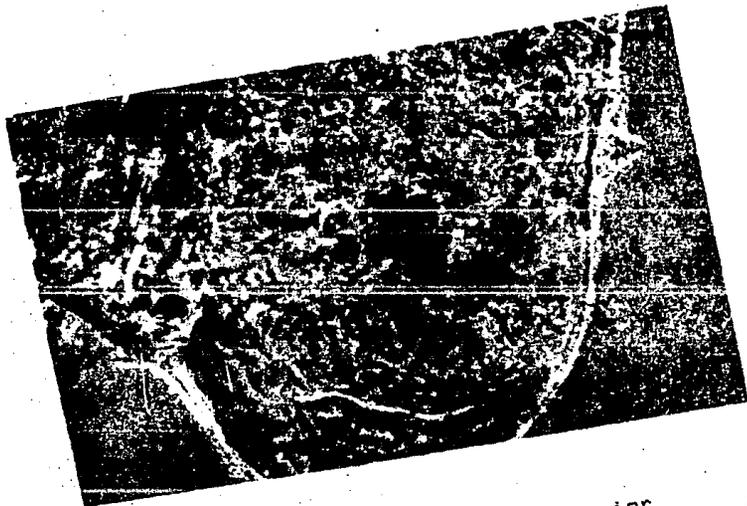


FOTO 5. Detalle de la fotografía anterior que muestra la distribución de los plastidios alrededor del núcleo. x400



FOTO 6. Célula parenquimatosa, proveniente de plantas de hipocotilo. Tinción con azul de toluidina, en contraste de fases. x100

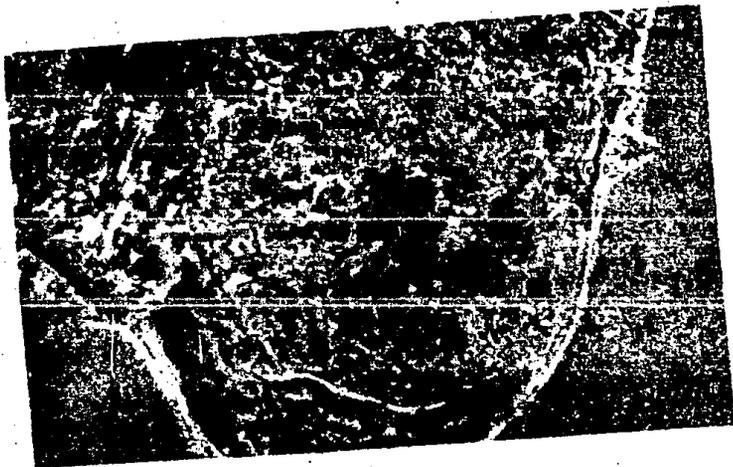


FOTO 5. Detalle de la fotografía anterior que muestra la distribución de los plastidios alrededor del núcleo. x400



FOTO 6. Célula parenquimatosa, proveniente de un plántula de hipocotilo. Tinción con azul de toluidina, en contraste de fases. x100

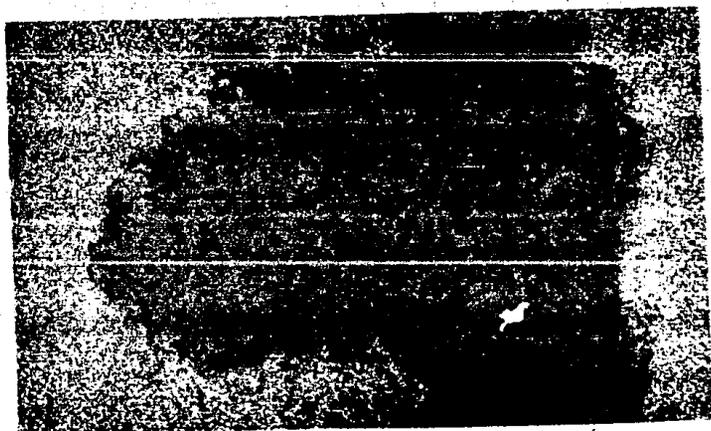


FOTO 7. Extremo de un explante de hipocotilo que muestra la proliferación celular inducida. Tinción con azul de toluidina. x100

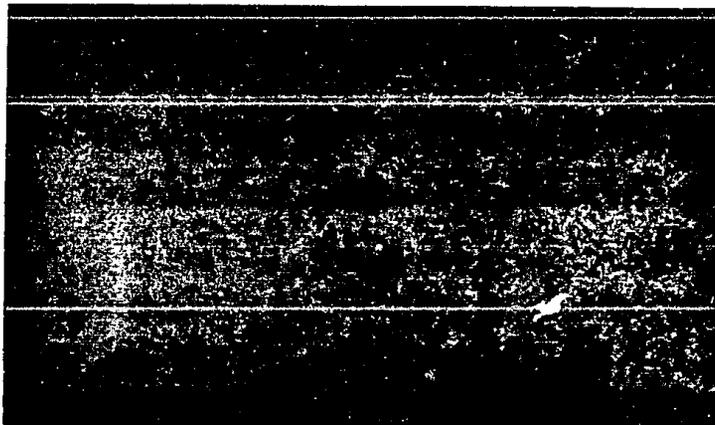


FOTO 8. Callo proveniente de explantes de hipocotilo  
mostrando la presencia de células vasculares  
Tinción con azul de toluidina. x100

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

El método de desinfección superficial, empleado sobre el material biológico, resultó adecuado para la eliminación de agentes contaminantes, mientras que por otra parte se conserva un alto porcentaje de germinación (93.95 %), lo que indica un nulo efecto del tratamiento sobre el metabolismo de la semilla. La conveniencia del empleo de un tratamiento ácido durante la postdesinfección, discutida por Abdul-Baki (1974 a y b), requiere de efectuar pruebas sobre otros parámetros como es la medida de descarboxilación de compuestos orgánicos que impidan su incorporación al metabolismo celular, lo que explica que en contraste, durante las pruebas preliminares, con la eliminación del tratamiento ácido, no se encontrarán diferencias en el porcentaje de germinación, razón por la cual se eligió el método empleado, dada su facilidad y corto tiempo de desarrollo.

A partir de la cinética de germinación de las semillas fue posible establecer que el porcentaje de germinación máximo es alcanzado después de 88 hrs de incubación bajo condiciones de obscuridad continua, sin embargo, se mantienen durante un período mayor (5 días), a fin de estimular la elongación del hipocotilo, evitar un temprano desplegamiento de los folíolos, esto último se logra al colocar las plántulas bajo iluminación constante. El modelo empleado en la descripción de la cinética de germinación, permite un ajuste altamente significativo ( $p < 0.01$ ), de los datos experimentales.

En la etapa de inducción de callo, se observó la serie de

eventos característicos de esta respuesta morfogénica a las condiciones *in vitro* (Yeoman M.M. y Macleod J.A., 1977). En la Prueba preliminar I, se estableció que concentraciones de 10 y 1  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, en combinación con concentraciones de 0.01, 0.1 y 1  $\mu\text{M}$  de BAP, estimulan la inducción de callos, mientras que estas mismas concentraciones de 2,4-D con concentraciones mayores de BAP, inhiben el proceso. No se presentó respuesta en aquellos medios que contenían bajas concentraciones de la auxina (0.1 y 0.01  $\mu\text{M}$ ) así como tampoco en el medio libre de reguladores y en aquellos donde sólo se presentaba uno de los reguladores (Tablas 1-4), lo que indica que el explante no presenta un balance endógeno de reguladores que permita la formación de callos como respuesta a las condiciones de incubación y al "stress" ocasionado en el momento de la extracción de explantes.

Por otra parte, llama la atención el bajo porcentaje de inducción de callo mostrado por el conjunto de medios óptimos para el caso de los explantes de hipocotilo con respecto al porcentaje obtenido en los explantes de folículo, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en el efecto de los diversos tratamientos, con respecto al tipo de explante ( $p > 0.05$ ).

En la segunda prueba preliminar, se emplearon las concentraciones que mostraron ser más adecuadas, de ambos reguladores, ampliando el rango con el incremento de la concentración de 2,4-D. Se corroboraron las observaciones hechas a partir de la prueba preliminar I, las concentraciones de 1 y 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 0.01 y 0.1  $\mu\text{M}$  de BAP mostraron una mejor respuesta,

al ser contrastadas, contra los medios que contenían 100  $\mu\text{M}$  de la auxina y el medio libre de reguladores; las diferencias son significativas ( $p < 0.05$ ).

En esta prueba, se invierte la relación del porcentaje de inducción para los tratamientos que muestran una respuesta óptima, entre ambos tipos de explante, mientras que la prueba U de Mann-Whitney indicó nuevamente que no existen diferencias significativas entre la respuesta observada en los tratamientos, que pueda ser atribuida al tipo de explante.

A partir de los resultados obtenidos, se diseñó la prueba final, en la cual se buscó la caracterización del proceso de inducción de callo y la definición de una combinación óptima, de reguladores en el medio, para cada tipo de explante. En el caso de los explantes foliares, la prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre los tratamientos y la prueba de comparación múltiple permitió definir como concentración óptima, con una clara separación de los demás tratamientos, la contenida en el medio D5E6, esto es con una concentración de 10 y 1  $\mu\text{M}$  para la auxina y la citocinina, respectivamente, con un porcentaje de inducción promedio de 99.73 %; seguido por el medio D5B7 con un porcentaje de 88.86 %, mostrando que ambos medios muestran una mejor respuesta, a la observada en el medio que contenía 1  $\mu\text{M}$  de 2,4-D; así mismo es posible observar que altas concentraciones de 2,4-D combinadas con bajas concentraciones de BAP (medio D5B8), inhibe la inducción a aproximadamente la mitad, de los niveles observados en el medio óptimo (Tabla 10), si bien, dicho efecto no fue claramente observado en las dos pruebas preliminares.

En los explantes de hipocotilo, el medio óptimo indica requerimientos diferentes entre los tipos de explantes, dado que en este caso el medio óptimo fué D6B8 con un 96.68 % de porcentaje de inducción, seguido de un grupo de tratamientos, que no muestran diferencias significativas entre sí, constituido por los medios D6B6, D6B7 y D5B6 (Tabla 12). En este caso, concentraciones de  $1 \mu\text{M}$  de 2,4-D estimulan la formación de callos mientras que la concentración de  $10 \mu\text{M}$  la inhiben a niveles muy bajos.

Los resultados observados confirman la importancia de la definición de condiciones óptimas para el desarrollo de los eventos morfogénéticos, para cada tipo de explante, lo cual ha sido reportado anteriormente en diversas especies (Yeoman N.M. y Macleod J.A., 1977).

Entre las aportaciones del presente trabajo, a la caracterización de los sistemas de cultivos de callos, se encuentra el empleo de un modelo matemático que describa la cinética de inducción y que en el caso de Physalis ixocarpa, correspondió a un modelo logístico, el cual mostró la más alta correlación y el mejor ajuste, contrastado con los modelos logarítmico, semilogarítmico y lineal, mediante un sencillo programa para microordenador elaborado por el autor.

En las gráficas 2 y 3, correspondientes a las curvas teóricas para la cinética de inducción de callo en los medios óptimos de explantes foliares y de hipocotilo, respectivamente, es posible observar el ajuste logrado con los datos experimentales, lo cual fué corroborado mediante el análisis de

En los explantes de hipocotilo, el medio óptimo indica requerimientos diferentes entre los tipos de explantes, dado que en este caso el medio óptimo fué D6B8 con un 96.68 % de porcentaje de inducción, seguido de un grupo de tratamientos, que no muestran diferencias significativas entre sí, constituido por los medios D6B6, D6B7 y D5B6 (Tabla 12). En este caso, concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  de 2,4-D estimulan la formación de callos mientras que la concentración de 10  $\mu\text{M}$  la inhiben a niveles muy bajos.

Los resultados observados confirman la importancia de la definición de condiciones óptimas para el desarrollo de los eventos morfogénéticos, para cada tipo de explante, lo cual ha sido reportado anteriormente en diversas especies (Yeoman N.M. y Macleod J.A., 1977).

Entre las aportaciones del presente trabajo, a la caracterización de los sistemas de cultivos de callos, se encuentra el empleo de un modelo matemático que describa la cinética de inducción y que en el caso de Physalis ixocarpa, correspondió a un modelo logístico, el cual mostró la más alta correlación y el mejor ajuste, contrastado con los modelos logarítmico, semilogarítmico y lineal, mediante un sencillo programa para microordenador elaborado por el autor.

En las gráficas 2 y 3, correspondientes a las curvas teóricas para la cinética de inducción de callo en los medios óptimos de explantes foliares y de hipocotilo, respectivamente, es posible observar el ajuste logrado con los datos experimentales, lo cual fué corroborado mediante el análisis de

varianza que en ambos casos resultó altamente significativo ( $p < 0.01$ ). Así mismo es posible establecer que si bien en los datos experimentales no se muestra la fase lag, esta puede presentarse durante el período inicial, en el que los explantes incrementan su volumen y pierden la pigmentación. el valor absoluto de la pendiente de la regresión corresponde a la velocidad de inducción de callo, esto es, el incremento del porcentaje de inducción con respecto al tiempo, mientras que la fase estacionaria y con ella la estimación del porcentaje de inducción máximo, nos permiten estimar la capacidad morfogenética del tipo de explante bajo las condiciones de cultivo establecidas.

Resulta necesario hacer hincapié en la conveniencia de modificar el criterio empleado en el presente trabajo, para considerar la formación del callo, dado que el hecho de no observar la presencia de una fase lag en los datos experimentales, es atribuible a cierta sincronía en el desarrollo de los callos, con lo que se observan cambios muy radicales, en las primeras etapas, en el porcentaje de inducción. Si bien esta sincronía no es generalizable a otras especies, donde la heterogeneidad del explante empleado podrá mostrar, en consecuencia, claras diferencias al definir un diámetro aproximado como criterio para considerar callo a la proliferación celular.

La optimización de las técnicas, en el establecimiento de los cultivos celulares, involucra la eliminación, en lo posible, de otras respuestas morfogenéticas como la inducción de raíces o

de brotes, en este sentido, se evaluó el porcentaje de rizogénesis en los diferentes tratamientos para cada tipo de explante, resultados que se indican en las Tablas 13 a 16. En los explantes foliares, para el medio D5B4, óptimo en la inducción de callo, el porcentaje de rizogénesis fue de 18.53 %, el cual, si bien no es muy adecuado, resulta bajo en comparación con el porcentaje obtenido en el medio D6B8, que estimula la inducción de raíces, con un 67.92 %. Este tipo de explante, muestra un escaso potencial para el desarrollo del evento, dado los resultados observados en el medio libre de reguladores de crecimiento, con un 0.27 % de rizogénesis. Es conveniente señalar que en este caso, no se sigue el patrón observado en otras especies de la Familia Solanaceae (Kantha K.K., 1982), en la relación entre el balance de reguladores y la respuesta morfogénica.

En los explantes de hipocotilo se observa, a partir del porcentaje de rizogénesis en el medio D0B0, un elevado potencial de este tipo de explante para desarrollar raíces, lo cual es atribuible al balance de reguladores endógenos; mientras que al aplicarlos de manera exógena, el proceso se inhibe en proporción inversa al incremento de la concentración de 2,4-D. En el medio D6B8, que resultó óptimo para la inducción de callos, se obtuvo un promedio de 32.08 % de rizogénesis que podría ser alto sin embargo es similar, la proporción guardada con el medio D0B0, con la observada entre el medio D5B4 y D6B8, en los explantes foliares (Tabla 14).

En el cultivo de callos es común el empleo de criterios

subjetivos que atienden al aspecto macroscópico para la evaluación del callo inducido. En este sentido es generalizado el criterio de considerar como un callo apropiado para el establecimiento de cultivos en suspensión, a aquellos que muestran una consistencia friable, textura granular o porosa y carentes de pigmentación que indiquen necrosis (café-pardo) o actividad fotosintética (verde). Por ello, se obtuvieron porcentajes de cada una de estas características para el total de callos obtenidos en cada tratamiento (Tabla 17 y 18), en general el medio D5B6 en explantes foliares presenta callos con textura granular y consistencia friable, mientras que en su mayor parte muestran una pigmentación café que indica inicios de necrosis, atribuible a la acumulación de toxinas en el medio o bien a la disminución de la concentración de nutrientes en el medio. En los explantes de hipocotilo, en el medio D6B8 se presenta un 97.2 % de callos granulares y friables con pigmentación hialina en su mayoría, hay un bajo porcentaje de necrosis, representado por el 13.9 % de callos cafés. Es claro que estos criterios nos permiten contar con algunos parámetros útiles en la selección de medios de cultivo, sin embargo, no serán determinantes por ellos mismos.

En la etapa constituida por el establecimiento de cultivos en suspensión, se optó por emplear el mismo medio de cultivo empleado en la inducción de callos, la primera observación relevante, fué el desarrollo de raíces a partir de pequeños agregados celulares en el cultivo proveniente de explantes foliares en medio D5B6 (Foto 1), en cuya obtención se emplearon callos friables; mientras que en el caso del cultivo proveniente

de explantes de hipocotilo, en medio D6B8 (Foto 2), si bien existía agregación celular, no se presentó el evento de rizogénesis.

Es conocida la importancia de las condiciones de cultivo, como lo es la consistencia del medio, en la respuesta observada tanto en los cambios en la consistencia del cultivo (friabilidad), como en la inducción de eventos morfogénéticos (Yeoman M.M. y Macleod J.A., 1977; Street E.H., 1977; Reinert J., et al, 1977). En este sentido, resulta explicable la tendencia a la agregación celular y la ocurrencia de organogénesis en el cultivo, como una respuesta al cambio de medio semisólido a medio líquido.

Por esta razón, se eligió finalmente el medio D6B8 y los explantes de hipocotilo, como los más indicados para el establecimiento y mantenimiento de los cultivos celulares, en Physalis ixocarpa var. Rendidora. Finalmente, se procedió a la caracterización de la cinética de crecimiento del cultivo.

Al igual que en el caso de la inducción de callos, se contrastaron los diferentes modelos de crecimiento que podrían describir los datos experimentales, observándose (Gráfica 4), que el mejor ajuste se presenta con el empleo del modelo logístico ( $p < 0.05$ ). Mediante el empleo de la transformación Walford, se estimó la capacidad máxima del cultivo, que correspondió aproximadamente a  $4.75 \times 10^5$  cels./ml, la cual se alcanzaba a los 19 días de cultivo.

En contraste con otros cultivos, la densidad celular alcanzada, con la capacidad máxima del medio de cultivo, resulta

baja (Street E.H., 1977; King J.P. y Street E.H., 1977), sin embargo la densidad alcanzada con la capacidad máxima del medio, empleando 5 ml como inóculo, provee del mínimo de la densidad mínima efectiva (Street E.H., 1977), para mantener el cultivo mediante subcultivos de la suspensión. La baja densidad puede ser atribuida a la posibilidad de que el medio de cultivo no reúna las condiciones óptimas para el crecimiento de la población, lo cual será necesario abordar a fin de contar con densidades celulares altas que ofrezcan mayores posibilidades de éxito en la técnica de plaqueo del cultivo en suspensión, una etapa crítica durante la selección in vitro (Street E.H., 1977).

En el análisis microscópico efectuado, todas las observaciones coinciden con lo reportado para otras especies (Yeoman M.M. y Street E.H., 1977).

Las características de pared celular, arreglo del citoplasma, núcleo y vacuolas, permiten afirmar que las células mantenidas en el cultivo en suspensión son células diferenciadas, específicamente del tipo parenquimatoso. Lo cual apoya el planteamiento que se ha hecho por otros autores (Murashige T., 1979), para establecer que los callos no están constituidos por células dediferenciadas, por lo menos no es generalizable, cuando se emplean explantes somáticos distintos a tejidos embrionarios o meristemáticos. Así mismo, la notable variación en la forma de las células, puede representar la presencia de mutantes, como se ha establecido en otras especies (Yeoman M.M. y Street E.H., 1977), lo cual representa una ventaja para abordar el aislamiento de líneas celulares mutantes.

## BIBLIOGRAFIA

Abdul-Baki, A.A. (1974a). Hypochlorite and tissue sterilization. *Planta* 115:373-376.

Abdul-Baki, A.A. (1974b). Pitfalls in using sodium hypochlorite as a seed desinfectant in  $^{14}\text{C}$  incorporation studies. *Plant Physiol.* 53:768-771.

Aitchison A.P., Macleod J.A. and Yeoman M.M. (1977). Growth patterns in tissue (callus) cultures. En: Street E.H. (ed.). *Plant tissue and cell culture*. 2nd. ed. Blackwell Sci. Publications. Oxford. pp 267-306.

Alfaro S.G. (1980). Estudio edafológico del Ejido de Xochimilco (Cienaga Grande). Tesis Profesional. Fac. Ciencias. U.N.A.M.

Bagchi A., et al (1984). Withaperuvín E and Nicandrin B, withanolides from Physalis peruviana and Nicandra physaloides. *Phytochem.* 23(4):853-855.

Bayliss M.W. (1972). Origin of chromosome number variations in cultured plant cells. *Nature* 246:529-530.

Bold C.H., Alexopoulos J.C. and Delevoryas T. (1980). *Morphology of plants and fungi*. 4th ed. Harper & Row. New York. 819 p.

Carlson S.P. (1970). Induction and isolation of auxotrophic mutants in somatic cell cultures of Nicotiana tabacum. *Science* 168:487-489.

Carlson S.P. and Polacco C.J. (1975). Plant cell cultures: Genetic aspects of crop improvement. *Science* 188:622-625.

Castillo G. (1986). Comisión de Ecología de la Delegación Xochimilco. Comunicación personal.

Chaleff S.R. and Keil L.R. (1981). Genetic and physiological variability among cultured cells and regenerated plants of Nicotiana tabacum. *Mol. Gen. Genet.* 181:254-256.

Chen W.H., Cockburn W. and Street E.H. (1982). Cell plating and selection of cold-tolerant cell lines in sugarcane. En: Fujigara A. (ed.). *Proc. 5th. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*. Tokio. pp 185-186.

D'Amato F., et al (1980). Nuclear fragmentation followed by mitosis as mechanism for wide chromosome number variation in tissue cultures: Its implications for plant regeneration. En: Sala F., et al (eds.). *Plant tissue cultures: Results and perspectives*. Elsevier/North-Holland Biomed. Press. pp 67-71.

- Davis D.B., et al. (1978). Tratado de Microbiología. Salvat. Barcelona. pp 1475-1486.
- D.D.F. (1980). Plan parcial de desarrollo urbano. Delegación Xochimilco. México.
- Dix J.P. and Street H.E. (1975). Sodium chloride-resistant cultured cell lines from Nicotiana glauca and Capsicum annuum. Plant. Sci. Lett. 5:231-237.
- Dodds H.J. and Roberts W.L. (1982). Experiments in plant tissue culture. Cambridge Univ. Press. Cambridge. 178 p.
- Duchauffour P. (1975). Manual de Edafología. Toray-Masson, S.A. Barcelona. 476 p.
- García M.E. (1980). Apuntes de Climatología. 3a. ed. México. 153 p.
- Garza L.J.M. (1984). Apuntes para la Unidad I. Producción de Hortalizas. La producción de Hortalizas en México: Su importancia. Depto. de Fitotécnia. U.A.CH. México.
- Giffard S., Collin H. and Putwain P. (1982). Selection for Asulam resistance in barley. En: Fujiwara A. (ed.). Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Tokio. pp 181-182.
- Green E.C. (1977). Prospects for crop improvement in the field of cell culture. Hort. Science 12:131-134.
- Guerrier G. (1983). Variations des teneurs en  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{++}$  d'embryons et jeunes plantes lors de la germination on milieu salé. Phytol 43(2):141-152.
- Handa K.A., Bressan A.R., Handa S. and Hasegawa M.P. (1982). Tolerance to water and salt stress in cultured cells. En: Fujiwara A. (ed.). Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Tokio. pp 471-474.
- Herrera E.L., Depicker A., Van Montagu M. and Schell J. (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. Nature 303:209-213.
- Hollander M. and Wolfe, D.A. (1973). Non parametric statistical methods. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A. 503 p.
- Horsch B.R. and Jones E.G. (1980). The selection of resistance mutants from cultured plant cells. Mutation Res. 72:91-100.
- Hurtado N.D.U. y Merino M.M.E. (1987). Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas. México. 232 p.
- Kaitha K.K. (1982). Organogenesis and embryogenesis. En: Wetter

R.L. and Constabel F. (ed.). Plant tissue culture methods. N.R.C.C. Saskatoon. pp 10-18.

Kibler R. and Neumann H. (1980). On cytogenetic stability of cultured tissue and cell suspensions of haploid and diploid origin. En: Sala F., et al. (eds.). Plant cell cultures: Results and perspectives. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp 59-65.

King J.P. and Street E.H. (1977). Growth patterns in cell cultures. En: Street E.H. (ed.). Plant tissue and cell culture. 2nd. ed. Blackwell Sci. Publications. Oxford. pp 307-357.

Koo S.K.F. (1982). Induction of mutations with EMS for resistance to heavy metals in cultured haploid cells of Nicotiana tabacum. En: Fujiwara A. (ed.). Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Tokio. pp 471-474.

Kramer J.P. (1969). Plant and soil water relationships: A modern synthesis. Mc Graw-Hill Book Co. New York. 482 p.

Little M.T. y Hills J.F. (1976). Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Trillas. México. 270 p.

López P.C. (1985). Mecanismos celulares de la tolerancia a factores ambientales adversos. Memorias del ciclo de Conferencias. Cultivo de Tejidos Vegetales, sus aplicaciones. Fac. de Ciencias. U.N.A.M. pp 13-35.

Loyola V.M. y Reyes L.J. (1985). El cultivo de tejidos vegetales para la producción de sustancias naturales. En: Robert L.M. y Loyola V.M. (comp.). El cultivo de tejidos vegetales en México. Conacyt. México. pp 111-128.

Mantell H.S., Matthews A.J. and McKee A.R. (1985). Principles of plant biotechnology. Blackwell Sci. Publications. Oxford. 269 p.

Mohandas T. and Grant F.W. (1972). Cytogenetic effects of 2,4-D and amitrole in relation to nuclear volume and DNA content in some higher plants. Can. J. Genet. Cytol. 14:773-783.

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

Murashige T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25:135-166.

Murashige T. (1979). Plant tissue culture and its importance to agriculture. En: Maramoroch K. and Hirumi T. (eds.). Practical tissue culture applications. Academic Press. New York. pp 27-44.

Ojima K. and Ohira K. (1979). Nutritional requirements of callus

and cell suspension cultures. En: Thorpe A.T. (ed.). *Frontiers of Plant Tissue Culture. Proc. 4th Int. Cong. Plant Tissue Culture.* Calgary. pp 265-275.

Ojima K. and Ohira K. (1982). Characterization and regeneration of an aluminum-tolerant variant from carrot cell cultures. En: Fujiwara A. (ed.). *Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue and Cell culture.* Tokio. pp 475-476.

Pallares M.D. (1986). La implementación de huertos familiares como técnica alternativa en el aprovechamiento de recursos naturales en zonas suburbanas. Tesis Profesional. Fac. de Ciencias. U.N.A.M.

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

Power B.J., Cummins E.S. and Cocking C.E. (1970). Fusion of isolated plant protoplasts. *Nature* 225:1016-1018.

Quak F. (1977). Meristem culture and virus-free plants. En: Reinert J. and Bajaj Y.P.S. (ed.): *Plant cell tissue and organ culture.* Spring-Verlag. Berlin. pp 598-615.

Quintero R. (1985) Introducción al programa sobre el desarrollo de la biotecnología en México. En: Robert L.M. y Loyola V.M. (comp). *El cultivo de tejidos Vegetales en México.* Conacyt. México. pp 15-20.

Rajasekhar W.E., Edwards M., Wilson B.S. and Street E.H. (1971). Studies on the growth in culture of plant cells. XI. The influence of shaking rate on the growth of suspension cultures. *J. Exp. Bot.* 22:107-117.

Ramírez M.R., Cabrera P.J.L. y Ochoa A.N. (1985). Inducción de morfogénesis in vitro en tejidos de tomate de cáscara. Resumen del I Congreso Nal. de la Soc. Mex. Ciencias Hort. Hermosillo Son. México pp 85.

Robert L.M. (1985a). La producción de mutantes a partir de células cultivadas in vitro. *Memorias Ciclo de Conf.: Cultivo de Tejidos Vegetales y sus aplicaciones.* Fac. Ciencias. U.N.A.M. pp 57-74.

Robert L.M. (1985b). El potencial del cultivo in vitro de células vegetales en el mejoramiento genético de las plantas. En: Robert L.M. y Loyola V.M. (comp.). *El cultivo de tejidos vegetales en México.* Conacyt. México. pp 89-110.

Rojas R.T. (1983). La agricultura chinampera. *Compilación histórica.* Univ. Auton. Chapingo. México. 229 p.

- Rose D. and Martin M.S. (1974). Parameters for growth measurement in suspension cultures of plant cells. *Can. J. Bot.* 52:903-912.
- Rousenfell A.G. and Everhart H.W. (1953). *Fishery Science*. John Wiley & Sons, Inc. New York. pp 311-327.
- Rubluo I.A. (1985). Estrategias para la preservación del germoplasma vegetal in vitro. En: Robert L.M. y Loyola V.M. (comp.). *El cultivo de tejidos vegetales en México*. Conacyt. México. pp
- Russell U.E. (1941). *Soil conditions and plant growth*. 7na. ed. Longmans, Green and Co. Ltd. London. 688 p.
- S.A.R.H. (1983). Anuario estadístico de la producción agrícola de los E.U.M.. S.A.R.H. D.G.A. México. 287 p.
- Siegel S. (1972). *Estadística no paramétrica*. 2a ed. Trillas. México. 344 p.
- Sipahimalani A.T., Bapat V.A., Rao P.S. and Chadua M.S. (1981). Biosynthetic potential of cultured tissues and regenerated plants of Physalis minima. *J. Nat. Proc.* 44(1):114-118.
- Skirvin M.R. (1978). Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica* 27:241-266.
- Stewart Mc D.J. (1981). In vitro fertilization and embryo rescue. *Env. & Exp. Bot.* 21:301-315.
- Street E.H. (1977). Cell (suspension) culture techniques. En: Street E.H. (ed.). *Plant tissue and cell culture*. 2nd. ed. Blackwell Sci. Publications. Oxford. pp 267-306.
- Street E.H. and Shillito D.R. (1977). Nutrient media for plant organ, tissue, and cell culture. En: Rechcigl N. (ed.). *Handbook series and nutritional foods*. CRC Press. U.S.A. pp 305-359.
- Swanson B.E. and Tomes T.D. (1982). Expression of 2,4-D tolerance among plants regenerated from in vitro selection in birdsfoot trefoil. En: Fujiwara A. (ed.). *Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*. Tokio. pp 497-498.
- Tomes T.D. and Swanson B.E. (1982). Application of in vitro selection to plant improvement. En: Tomes T.D., et al (eds.). *Application of plant cell and tissue culture to agriculture and industry*. Univ. Guelph. Ontario. pp 25-43.
- Walford A.L. (1916). A new graphic method of describing the growth of animals. *Biol. Bull.* 90(2):141-147.
- Waterfall T.U. (1958). A taxonomic study of the genus Physalis in North America North of Mexico. *Rhodora* 60:152-173.

Widholm M.J. (1978). Selection and characterization of a Daucus carota L. cell line resistant four aminoacid analogues. J. Exp. Bot. 29:1111-1116.

Widholm M.J. (1983). Isolation and characterization of mutant plant cell cultures. En: Sen K.S. and Giles L.K. (eds.). Plant cell culture in crop improvement. Plenum Press. New York. pp 71-87.

Widholm M.J. (1984). Induction, selection and characterization of mutants in carrot cell cultures. En: Vasil I. (ed.). Cell culture and somatic cell genetics of plants. vol. 1. Academic Press. New York. pp 563-570.

Yeoman M.M. and Macleod J.A. (1977). Tissue (callus) cultures techniques. En: Street E.H. (ed.). Plant tissue and cell culture. 2nd. ed. Blackwell Sci. Publications. Oxford. pp 31-59.

Yeoman M.M. and Street E.H. (1977). General cytology of cultured cells. En: Street E.H. (ed.). Plant tissue and cell culture. 2nd. ed. Blackwell Sci. Publications. Oxford. pp 137-176.

## APENDICE A

### PREPARACION DEL MEDIO MURASHIGE-SKOOG

A fin de facilitar la preparación del medio de cultivo, formulado por Murashige T. y Skoog F. (1962), se preparan soluciones 25 y 100 veces más concentradas que la cantidad requerida en la formulación original. Estas soluciones concentradas o soluciones stock, son las siguientes:

SOLUCION 1:	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ..... 16.5 g
	KNO <sub>3</sub> ..... 19.0 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... 1.7 g
	MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O ..... 3.7 g
	H <sub>2</sub> O cbp 1000 ml
SOLUCION 2:	CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O ..... 11.0 g
	H <sub>2</sub> O cbp 250 ml
SOLUCION 3:	FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O ..... 0.695 g
	Na <sub>2</sub> ·EDTA ..... 0.9325 g
	H <sub>2</sub> O cbp 250 ml
SOLUCION 4:	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ..... 0.1550 g
	MnSO <sub>4</sub> ·4 H <sub>2</sub> O ..... 0.5575 g
	KI ..... 0.0207 g
	ZnSO <sub>4</sub> ·4 H <sub>2</sub> O ..... 0.2150 g
	STOCK A ..... 2.5 ml
	H <sub>2</sub> O cbp 250 ml

**SOLUCION 5:**

Glicina .....	20.0 mg
m-Inositol .....	1.0 g
Ac. Nicotínico ...	3.0 mg
Piridoxina-HCl ...	3.0 mg
Tiamina-HCl .....	1.0 mg
H <sub>2</sub> O cbp	100 ml

**SOLUCION STOCK A:**

NaMoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O .....	0.5 g
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O .....	0.05 g
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O .....	0.05 g
H <sub>2</sub> O cbp	200 ml

Posteriormente, para la preparación de un litro de medio de cultivo, se emplean 100 ml de la solución 1 y 10 ml de las soluciones 2, 3, 4 y 5. En el caso de que sean adicionados fitorreguladores del crecimiento como auxinas y citocininas, éstos son agregados antes de disolver sacarosa al 3% (p/v) y finalmente, se afora a 1000 ml. Si se emplea medio semisólido, antes de aforar se agrega agar al 1% (p/v). El pH del medio de ajusta a 5.8, empleando soluciones de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio 1 a 3 M, antes de esterilizar en autoclave a 121°C o 1.15 Kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 20 min.

## APENDICE B

### ANALISIS DE VARIANZA A DISTRIBUCION LIBRE PARA RANGOS DE KRUSKAL-WALLIS

El análisis de varianza de una clasificación por rangos de Kruskal-Wallis, permite decidir si  $k$  muestras independientes proceden de poblaciones estadísticamente diferentes. Al igual que todas las pruebas estadísticas no paramétricas, su modelo no especifica las condiciones de los parámetros de las poblaciones en cuestión, esto es, se trata de una prueba a distribución libre, lo cual si bien implica la suposición de independencia y que se trate de variables continuas, su exigencia es menor contrastada con una prueba paramétrica que exige además una distribución normal de la población estadística. Por otra parte, las pruebas no paramétricas permiten su empleo con variables medidas en escala ordinal, como es nuestro caso, y aún de mediciones en escala nominal.

La prueba de Kruskal-Wallis supone que la variable en estudio tiene una distribución continua como base, por lo cual se requiere al menos, de una medición en escala ordinal. Al calcularla, cada una de las  $N$  observaciones es reemplazada por rangos, esto es, todas las observaciones de las  $k$  muestras se ordenan en una sola serie y el puntaje más pequeño es sustituido por el rango 1, el siguiente más grande por el rango 2 y así sucesivamente.

Posteriormente, se suman los rangos correspondientes a cada

una de las  $k$  muestras y se procede a determinar si la desigualdad entre las sumas es tan grande que probablemente no proceden de la misma población bajo la hipótesis nula de que:

$$H_0 : T_A = T_B = \dots = T_K$$

Para lo cual se calcula el valor del estadístico  $H$ , empleado por la prueba, y definido como:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \left[ \sum_{j=1}^{j=k} \frac{R_j^2}{n_j} \right] - 3(N+1)$$

donde  $k$  = núm. de muestras

$n_j$  = núm. de observaciones para  $k=j$

$R_j$  = suma de rangos para  $k=j$

$N$  = núm. total de observaciones

La regla de decisión consistirá en que a un nivel  $\alpha$  de significación, se rechaza  $H_0$  si el valor de  $H \geq h_{(\alpha, n_1, n_2, \dots, n_k)}$  o bien se rechaza  $H_0$  si el valor de  $H \geq \chi^2_{(\alpha, k-1)}$ , cuando el número de observaciones excede a 5 o el número de muestras es mayor que 3, puesto que en este caso el estadístico  $H$  se aproxima a la distribución de  $\chi^2$  con  $k-1$  grados de libertad, por lo cual la probabilidad asociada, conforme  $H_0$ , de valores tan grandes como el de  $H$  observada se puede determinar con la tabla de  $\chi^2$ , cuándo no es así, si  $k < 3$  y  $n < 5$ , se cuenta con la tabla de probabilidades exactas para valores de  $H$  observada.

Por otra parte, cuando ocurren ligas entre dos o más observaciones, esto es, que tienen el mismo valor, cada puntaje es reemplazado por la media de los rangos con que se encuentra

ligado y resulta entonces necesario corregir el valor de  $H$ , para obtener  $H'$ , mediante:

$$H' = \frac{H}{1 - \frac{\sum T}{N^3 - N}}$$

donde  $T = t^3 - t$ , cuando  $t$  es el núm. de puntajes ligados con el mismo valor.

La prueba de Kruskal-Wallis tiene una potencia-eficiencia de 95.5% cuando es comparada con la prueba paramétrica de análisis de varianza de Fisher para un diseño completamente aleatorizado (Siegel S., 1972).

## APENDICE C

### COMPARACION MULTIPLE A DISTRIBUCION LIBRE PARA SUMAS DE RANGOS DE KRUSKAL-WALLIS

Esta prueba es el equivalente a la prueba paramétrica de diferencia mínima significativa de Duncan, empleada en la separación de medias después del análisis de varianza de Fisher, esto es, permite determinar cuales muestras proceden de la misma población y cuales de poblaciones estadísticamente diferentes, mediante el cálculo de las  $k(k-1)/2$  diferencias absolutas entre cada par de muestras a examinar.

En nuestro caso, donde  $k$  es mayor que 3 y el número de repeticiones excede a 5, la regla de decisión es:

$$T_u \neq T_v \text{ si } |R_u - R_v| > q_{(\alpha, k, \infty)} \left[ \frac{k(kn+1)}{12} \right]^{1/2}$$

donde  $T_u$  = efecto del tratamiento  $u$

$k$  = núm. de muestras

$n$  = núm. de observaciones

El valor de  $q$  se encuentra tabulado para el número de muestras y de observaciones correspondientes, con un nivel  $\alpha$  de significación. Para la elección de otras reglas de decisión, se puede consultar a Hollander M. y Wolfe A.D., 1973.

## APENDICE D

### PRUEBA U DE MANN-WHITNEY

Esta prueba es la alternativa más adecuada ante la prueba paramétrica  $t$  de Student, esto es, se trata de una prueba no paramétrica que permite decidir si dos muestras independientes han sido tomadas de la misma población, por lo cual:

$$H_0 : \tau_1 = \tau_2 \quad \text{y} \quad H_1 : \tau_1 \neq \tau_2$$

Se requiere que la variable haya sido medida por lo menos en una escala ordinal. Para su cálculo, los valores de las observaciones son sustituidos por rangos, para obtener la suma de estos en cada una de las muestras y proceder a obtener el valor del estadístico  $U$ , mediante:

$$U = n_1 n_2 + \frac{n_1 (n_1 + 1)}{2} - R_1$$

o bien,

$$U = n_1 n_2 + \frac{n_2 (n_2 + 1)}{2} - R_2$$

donde  $R_1$  es la suma de rangos correspondientes a la muestra de tamaño  $n_1$  y  $R_2$  es la suma de rangos de la muestra con tamaño  $n_2$

Las dos fórmulas a emplear, proporcionan diferentes valores de  $U$ , sin embargo el verdadero valor es el menor de los obtenidos, el otro se denomina  $U'$ . Para verificar, se emplea:

$$U = n_1 n_2 - U'$$

La regla de decisión es:

$$\tau_1 \neq \tau_2 \quad \text{si} \quad U > U_{(\alpha, n_1, n_2)}$$

donde el valor del estadístico  $U$ , bajo  $H_0$ , se encuentra tabulado para un nivel  $\alpha$  de significatividad, con  $n_1$  y  $n_2$  grados de libertad.

## APENDICE E

### ANALISIS DE VARIANZA PARA RECTAS DE REGRESION

En general, las rectas de regresión obtenidas a partir de un ajuste de los datos experimentales a una recta, mediante el método de mínimos cuadrados, presentarán una dispersión de los valores experimentales con respecto a los valores teóricos. El efectuar una prueba de análisis de varianza para la regresión obtenida, permitirá contrastar la hipótesis nula de que no hay correlación entre las dos variables involucradas y que la aparente relación lineal se puede atribuir al azar (Little M.T. y Hills J.F., 1976).

El criterio de decisión será el rechazar  $H_0$ , cuando el valor de F observado sea mayor o igual que el valor F en tablas con cierta probabilidad de cometer error tipo I.

En la siguiente tabla de análisis de varianza, se indican los cálculos a efectuar en la prueba:

TABLA ANOVA

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
TOTAL	n-1	$\sum y$		
REGRESION	1	$r^2 \sum y$	SCR/1	CMR/CMD
DESVIACION	n-2	$(1-r^2) \sum y$	SCD/n-2	

Donde:

n = núm. total de datos

$$\sum y = \sum (Y - \bar{Y})^2$$

r = Coeficiente de correlación

F.V. = Fuente de variación  
G.L. = Grados de libertad  
S.C. = Suma de cuadrados  
C.M. = Cuadrado medio  
F = Valor F (Fisher)

Es importante señalar que un alto valor del coeficiente de correlación, que además resulte significativo, no necesariamente implica una relación causa-efecto entre las variables involucradas.

## APENDICE F

## TRANSFORMACION WALFORD

El método analítico conocido como transformación Walford, es una alternativa a otros métodos gráficos y semigráficos empleados en la estimación del valor máximo obtenido en curvas de crecimiento de poblaciones o individuos, así como del período de tiempo necesario para alcanzar dicho valor máximo.

Este método propuesto por Walford A.L. en 1916 ha sido empleado satisfactoriamente para el análisis del crecimiento en especies animales (Rounsefell A.G. y Everhart H.W., 1953) y recientemente para un análisis similar de la germinación en semillas de maíz (Lozano R.J.L., comunicación personal).

Se emplean los puntos obtenidos en una cinética de crecimiento, posteriores al punto de inflexión de la curva sigmoide, que presenten el mismo intervalo de tiempo entre ellos.

Se efectúa una transformación de la curva de crecimiento mediante la graficación de los valores del parámetro de crecimiento para los  $n$  valores del período de tiempo a lo largo del eje de las ordenadas y de los mismos valores del crecimiento para los  $n+1$  valores del período de tiempo, a lo largo del eje de las coordenadas. Con ello se obtiene una línea recta (Figura E1).

Es posible establecer que una línea recta con un ángulo de  $45^\circ$  que parta del origen, representará la situación en la cual

el crecimiento en un determinado tiempo, será igual al crecimiento en el valor de tiempo siguiente, con el mismo intervalo, en otras palabras, no habrá cambio en el valor de crecimiento.

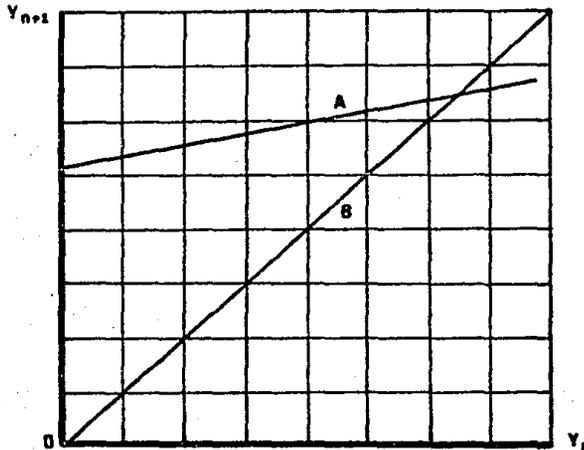


Fig. El Transformación Walford.  
 A) Recta obtenida de la transformación de datos  
 B) Recta de  $45^\circ$

La recta resultante de la transformación, presentará una pendiente  $k$  que es una constante positiva y menor de uno, que al interceptar a la recta de  $45^\circ$ , coincidirá con ella en la característica de que a valores secuenciales de tiempo, correspondan valores del crecimiento iguales.

Ese punto de intersección, representa el valor máximo alcanzado por la curva de crecimiento y a su vez permitirá obtener el valor del período de tiempo en que es alcanzado, mediante su sustitución en la función del modelo matemático de crecimiento.

Para la obtención del punto de intercepción, se resuelve para un sistema de ecuaciones simultáneas, que una vez despejadas, corresponden a:

$$Y_{\max} = \frac{b_1}{1 - m_1}$$

donde  $Y_{\max}$  es el valor máximo del crecimiento;  $b_1$  y  $m_1$  serán los valores de ordenada al origen y pendiente, respectivamente, obtenidos de la regresión lineal para la recta resultante de la transformación.