

66
2e;



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTABLECIMIENTO DE LA METODOLOGIA PARA
EL ESTUDIO IN VITRO DE Amaranthus cruentus y
Amaranthus hypochondriacus**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
PATRICIA GARCIA SANCHEZ

México, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

INDICE

	Pag.
RESUMEN	
1. INTRODUCCION	1
<i>Objetivos particular y generales</i>	3
2. REVISION DE LITERATURA	
2.1 Antecedentes del Amaranto	4
2.1.1 <i>Historia</i>	4
2.1.2 <i>Taxonomía</i>	4
2.1.3 <i>Distribución y ecología</i>	5
2.1.4 <i>Fisiología</i>	6
2.1.5 <i>Producción</i>	7
2.1.6 <i>Plagas y enfermedades</i>	7
2.1.7 <i>Composición física y química de semillas y hojas</i> ...	8
2.2 Cultivo de tejidos vegetales	9
2.2.1 <i>Historia</i>	9
2.2.2 <i>Establecimiento</i>	10
2.2.3 <i>Fitohormonas</i>	11
2.2.4 <i>Cultivo de callos</i>	14
2.2.5 <i>Cultivo de células en suspensión</i>	15
2.2.6 <i>Cinéticas de crecimiento</i>	16
2.2.7 <i>Morfogénesis</i>	16
2.2.7.1 <i>Organogénesis</i>	17
2.2.7.2 <i>Embriogénesis</i>	19

	Pág.
3. MATERIALES Y METODOS.	
3.1 <i>Material biológico</i>	20
3.2 <i>Germinación y esterilización de las semillas</i>	20
3.3 <i>Medios de cultivo básicos</i>	20
3.4 <i>Preparación de medios de cultivo</i>	21
3.5 <i>Condiciones ambientales del cultivo</i>	22
3.6 <i>Selección del explante</i>	23
3.7 <i>Cultivo de callos</i>	23
3.7.1 <i>Inducción de callos</i>	23
3.7.2 <i>Proliferación y mantenimiento del callo</i>	24
3.8 <i>Cultivo de células en suspensión</i>	25
3.8.1 <i>Establecimiento del cultivo</i>	25
3.8.2 <i>Mantenimiento y proliferación del cultivo de células</i>	26
3.9 <i>Organogénesis</i>	27
3.9.1 <i>Inducción, elongación y enraizamiento de brotes</i> ..	27
3.10 <i>Embriogénesis somática</i>	29
3.10.1 <i>Inducción</i>	29
3.11 <i>Determinación de metabolitos</i>	29
3.11.1 <i>Preparación del extracto</i>	31
3.11.2 <i>Determinación de aminoácidos totales</i>	31
3.11.3 <i>Determinación de amarantina</i>	31
3.11.4 <i>Determinación de aminos cuaternarias y glicina betaina</i>	31

	Pág.
3.11.5 Determinación de nitratos	32
3.11.6 Determinación de proteínas	32
3.11.7 Determinación de reductores totales (azúcares) y sacarosa	33
3.11.8 Análisis estadístico	33

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Amaranthus cruentus</i> L. <i>A. hypochondriacus</i> L.	34
4.1.1 Establecimiento del cultivo aséptico y selección del explante	34
4.1.2 Cultivo de callos	39
4.1.2.1 Inducción de callos	39
4.1.2.2 Proliferación y mantenimiento de callos	44
4.1.3 Cultivo de células en suspensión	52
4.1.3.1 Establecimiento del cultivo	52
4.2 Rediferenciación de callos	58
4.2.1 Organogénesis indirecta	58
4.2.2 Embriogénesis somática	68
4.3 Determinación de metabolitos	69
4.3.1 Aminoácidos	71
4.3.2 Amarantina	73
4.3.3 Nitratos	73
4.3.4 Proteínas	76

	<i>Pág.</i>
4.3.5 Reductores totales y sacarosa	76
4.3.6 Aminas cuaternarias y glicina betaina	78
5. <i>CONCLUSIONES</i>	80
6. <i>BIBLIOGRAFIA</i>	83
7. <i>APENDICE</i>	94

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Pág.
1 Tipo de explantes utilizados para la inducción de callos	23
2 Porcentaje de contaminación y germinación de semillas de <u>A. cruentus</u> y <u>A. hypochondriacus</u> sometidos a diferentes tratamientos de esterilización	36
3 Metodología de esterilización para las semillas de <u>A. cruentus</u> y <u>A. hypochondriacus</u>	37
4 Iniciación y porcentaje de formación de callo por tratamiento en <u>A. cruentus</u> y <u>A. hypochondriacus</u>	42
5 Cinética del crecimiento del cultivo de callos de <u>A. cruentus</u> en los tres mejores medios de cultivo, MS(1), B ₅ (5) y SH(9). (A) Peso fresco (g) y (B) Peso seco (mg)	46
6 Cinética del crecimiento del cultivo de callos de <u>A. hypochondriacus</u> en los tres mejores medios de cultivo MS(1), B ₅ (5) y SH(9). (A) Peso fresco (g) y (B) Peso seco (mg)	47
7 Cinética del crecimiento de callos de <u>A. cruentus</u> en el medio básico SH con diferentes combinaciones y concentraciones hormonales. (A) Peso fresco (g) y (B) Peso seco (mg)	50
8 Cinética del crecimiento de callos de <u>A. hypochondriacus</u> en el medio básico SH con diferentes combinaciones y concentraciones hormonales. (A) Peso fresco (g) y (B) Peso seco (mg)	51

- 9 Cinética del crecimiento del cultivo de células en suspensión de A. cruentus en los tres mejores medios de cultivo MS(1), B₅(5) Y SH(9). (A) Peso fresco (g) y (B) Peso seco (mg)..... 54
- 10 Cinética del crecimiento del cultivo de células en suspensión de A. hypochondriacus en los tres mejores medios de cultivo MS(1), B₅(5) Y SH(9). (A) Peso fresco (g) y (B) Peso seco (mg). 55
- 11 Número de células/25 ml de medio, viabilidad celular (%) y volumen del paquete celular/25 ml de medio, en el medio 9 (SH+2,4-D+BA) durante la cinética de crecimiento de células en suspensión de A. cruentus y A. hypochondriacus..... 57
- 12 Número de brotes por frasco y porcentaje de brotes por tratamiento en los diferentes medios usados en la inducción de brotes de A. cruentus y A. hypochondriacus..... 63
- 13 Efecto de diferentes combinaciones hormonales y concentraciones de sales SH sobre el crecimiento de brotes de A. cruentus y A. hypochondriacus..... 65
- 14 Efecto de diferentes auxinas en el número de raíces formadas por brote y porcentaje de raíces por tratamiento en brotes de A. cruentus y A. hypochondriacus..... 67
- 15 Concentración de aminoácidos totales durante la cinética del crecimiento de callos y células en suspensión de A. cruentus y A. hypochondriacus..... 72
- 16 Concentración de amarantina durante la cinética del crecimiento de callos y células en suspensión de A. cruentus y A. hypochondriacus..... 74

- 17 *Concentración de nitratos durante la cinética del crecimiento de callos y células en suspensión de A. cruentus y A. hypochondriacus.....* 75
- 18 *Concentración de proteínas durante la cinética del crecimiento de callos y células en suspensión de A. cruentus y A. hypochondriacus.....* 77
- 19 *Concentración de reductores totales y sacarosa durante la cinética del crecimiento de callos y células en suspensión de A. cruentus y A. hypochondriacus.....* 79

LISTA DE CUADROS

CUADROS	Pág.
1 <i>Cultivo in vitro</i> de <i>Amaranthus</i> spp.....	18
2 Tratamientos empleados para la esterilización de las semillas de <i>A. cruentus</i> y <i>A. hypochondriacus</i>	21
3 Tipos de hormonas e intervalos de concentraciones empleadas durante el cultivo de tejidos de <i>A. cruentus</i> y <i>A. hypochondriacus</i>	22
4 Tratamientos empleados en el estudio de diferentes medios básicos y de combinaciones y concentraciones hormonales para la inducción de callos en <i>A. cruentus</i> y <i>A. hypochondriacus</i>	24
5 Tratamientos empleados para determinar las combinaciones y concentraciones hormonales necesarias para la proliferación de callos de <i>A. cruentus</i> y <i>A. hypochondriacus</i>	25
6 Tratamientos empleados para determinar las combinaciones y concentraciones hormonales necesarias para la inducción de organogénesis en callos de <i>A. cruentus</i> y <i>A. hypochondriacus</i> ...	27
7 Tratamientos empleados para determinar las concentraciones hormonales y de sales del medio SH necesarias para inducir el alargamiento de brotes de <i>A. cruentus</i> y <i>A. hypochondriacus</i>	28
8 Tratamientos empleados para determinar el tipo y concentración de auxina necesaria para el enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes de <i>A. cruentus</i> y <i>A. hypochondriacus</i>	29
9 Tratamientos empleados para determinar las concentraciones y combinaciones hormonales sobre la inducción de embriones somáticos a partir de callos de <i>A. cruentus</i> y <i>A. hypochondriacus</i>	30

10	Respuesta de diferentes tipos de explantes de plántulas de 7 días de edad a la inducción de callo en <u>A. cruentus</u> y <u>A. hypochondriacus</u>	38
11	Efecto de diferentes medios básicos y combinaciones y concentraciones hormonales sobre la inducción de callo en <u>A. cruentus</u>	40
12	Efecto de diferentes medios básicos y combinaciones y concentraciones hormonales sobre la inducción de callo en <u>A. hypochondriacus</u>	41
13	Efecto de diferentes combinaciones hormonales sobre la inducción de brotes en callos de <u>A. cruentus</u> y <u>A. hypochondriacus</u> de diferente edad	62
14	Efecto de diferentes combinaciones hormonales en callos de <u>A. cruentus</u> y <u>A. hypochondriacus</u> de diferente edad	70

LISTA DE CUADROS DEL APENDICE

SECCION A CUADRO

Pág.

- A.1 Composición básica de los medios de cultivo empleados para el cultivo *in vitro* de A. cruentus y A. hypochondriacus 95
- A.2 Porcentaje de contaminación y germinación en las semillas de A. cruentus y A. hypochondriacus sometidas a diferentes tratamientos de esterilización 96
- A.3 Efecto de diferentes medios básicos y concentraciones y combinaciones hormonales sobre la inducción de callo en A. cruentus y A. hypochondriacus 97
- A.4 Cinética del crecimiento de callos de A. cruentus desarrollados en los medios de cultivo MS (1), B₅ (5) y SH (9) 98
- A.5 Cinética del crecimiento de callos de A. hypochondriacus desarrollados en los medios de cultivo MS (1), B₅ (5) y SH (9) 98
- A.6 Cinética del crecimiento de callos de A. cruentus desarrollados en el medio de básico SH y diferentes combinaciones y concentraciones hormonales 99
- A.7 Cinética del crecimiento de callos de A. hypochondriacus desarrollados en el medio básico SH y diferentes combinaciones y concentraciones hormonales 99
- A.8 Cinética del crecimiento de células en suspensión de A. cruentus desarrollados en los medios de cultivo MS (1), B₅ (5) y SH (9) 100

A.9	Cinética del crecimiento de células en suspensión de <u>A. hypochondriacus</u> desarrollados en los medios de cultivo MS (1), B ₅ (5) y SH (9)	100
A.10	Número de células durante la cinética del crecimiento del cultivo de células en suspensión de <u>A. cruentus</u> y <u>A. hypochondriacus</u> en el medio 9 (SH+BA+2,4-D)	101
A.11	Volumen del paquete celular durante la cinética del crecimiento del cultivo de células en suspensión de <u>A. cruentus</u> y <u>A. hypochondriacus</u> en el medio 9 (SH+BA+2,4-D)	101
A.12	Porcentaje de viabilidad de las células en suspensión durante la cinética del crecimiento de <u>A. cruentus</u> y <u>A. hypochondriacus</u> en el medio 9 (SH+BA+2,4-D)	102
A.13	Efecto de diferentes combinaciones hormonales en la inducción de brotes a partir de callos de <u>A. cruentus</u> y <u>A. hypochondriacus</u>	102
A.14	Efecto de diferentes combinaciones hormonales y concentraciones de sales del medio SH sobre el crecimiento de brotes de <u>A. cruentus</u> y <u>A. hypochondriacus</u>	103
A.15	Efecto de diferentes tipos y concentraciones de auxinas en la inducción de raíces en brotes de <u>A. cruentus</u> y <u>A. hypochondriacus</u>	104
A.16	Concentración de aminoácidos totales durante la cinética del crecimiento de callos y células en suspensión de <u>A. cruentus</u> y <u>A. hypochondriacus</u>	104

	Pag.
A.17 Concentración de amarantina durante la cinética del crecimiento de callos y células en suspensión de <u>A. cruentus</u> y <u>A. hypochondriacus</u>	105
A.18 Concentración de nitratos durante la cinética del crecimiento de callos y células en suspensión de <u>A. cruentus</u> y <u>A. hypochondriacus</u>	105
A.19 Concentración de proteínas durante la cinética del crecimiento de callos y células en suspensión de <u>A. cruentus</u> y <u>A. hypochondriacus</u>	106
A.20 Concentración de reductores totales y sacarosa durante la cinética del crecimiento de callos y células en suspensión de <u>A. cruentus</u> y <u>A. hypochondriacus</u>	107

SECCION B

Preparación de reactivos	109
--------------------------------	-----

ABREVIATURAS

<i>MS</i>	<i>Medio básico Murashige y Skoog (1962)</i>
<i>SH</i>	<i>Medio básico Shenk y Hildebrandt (1972)</i>
<i>B₅</i>	<i>Medio básico Gamborg et al. (1968)</i>
<i>2,4-D</i>	<i>Acido 2-4 diclorofenoxiacético</i>
<i>ANA</i>	<i>Acido Nagstalenacético</i>
<i>AIA</i>	<i>Acido Indolacético</i>
<i>BA</i>	<i>Benciladenina</i>
<i>K</i>	<i>Cinetina</i>
<i>GA₁</i>	<i>Acido Giberélico (Giberelina A₁)</i>
<i>PEG</i>	<i>Polietilenglicol</i>
<i>CTV</i>	<i>Cultivo de tejidos vegetales</i>

RESUMEN

El cultivo de tejidos vegetales puede ser una alternativa en la propagación y mejoramiento de las especies vegetales, además de ser un modelo útil para diversos estudios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos. En el presente trabajo se estableció la metodología para el estudio *in vitro* de dos especies de Amaranto, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*. Se obtuvo el cultivo aséptico esterilizando las semillas de ambas especies y germinándolas en condiciones de asepsia. Como explante más apropiado para la inducción de callos se eligieron las hojas cotiledonarias de plántulas de 7 días posgerminación y se sembraron en el medio básico SH adicionado con 2,4-D (1.0 mg/l) y BA (0.5 mg/l), este medio fue también en el que se obtuvo mejor respuesta para el mantenimiento y proliferación de callos y células en suspensión de ambas especies. Además se estableció la metodología para la cuantificación de la curva de crecimiento de callos y células en suspensión, el comportamiento que se presentó en éstas fue de tipo sigmoidal, completándose para el cultivo de callos a los 27 días y para las células en suspensión a los 21 días. El mejor parámetro para medir la cinética de células en suspensión fue el peso seco y en callos fue el peso seco y el peso fresco. Por otra parte se probaron diferentes combinaciones y concentraciones hormonales para obtener la rediferenciación de callos, así se obtuvieron brotes (organogénesis) a partir de callos de 2 meses de edad, el mejor medio fue el compuesto por el medio básico SH más la adición de BA (0.5 mg/l), asimismo se probaron diferentes medios en la elongación y enraizamiento de estos brotes, en este último sólo fue necesaria la presencia de sales del medio básico SH sin hormonas. En el caso de embriogénesis somática no se obtuvieron resultados satisfactorios. Por último se establecieron satisfactoriamente las metodologías para la cuantificación de diversos metabolitos (aminoácidos totales, amarantina, nitratos, proteínas, reductores totales y sacarosa) excepto la metodología de las aminas cuaternarias y prolina, todas las técnicas que se usaron fueron colorimétricas. Como conclusión general se puede decir que quedaron establecidas las bases metodológicas para que las especies *A. cruentus* y *A.*

***hypochondriacus* puedan ser usados como modelo biológico útil para diversos estudios, por ejemplo morfogénéticos (organogénesis, floración, embriogénesis), fisiológicos (respuestas de las células al estrés y diversos estímulos), así como en la micropropagación y mejoramiento de la planta.**

INTRODUCCION

Frecuentemente los países en desarrollo presentan problemas nutricionales, esto se debe a que su dieta se compone básicamente de semillas y hortalizas, ocasionando que aun cuando el aporte calórico sea el adecuado, sufran de mala nutrición, ya que la mayor parte de estos cultivos no suministran todos los aminoácidos que necesita el cuerpo (Marx, 1978). Todo esto ha provocado que el hombre busque nuevas alternativas para solucionar el problema alimentario. Desde hace algunos años se ha comenzado a revisar entre los cultivos usados por los indígenas, cuáles podrían surgir como un recurso a nivel mundial, y el amaranto (Amaranthus spp), junto con la quinua (Chenopodium quinoa) y el trigo sarraceno (Fagopyrum spp) que forman los llamados pseudocereales (Huzinkfer, 1943) han sido propuestos para este fin. En particular algunas especies de Amaranthus tienen un alto valor nutritivo superior al de los cereales comunes, ya que presentan una notable cantidad y calidad de proteína, además de un alto valor calórico, potencial agrícola, industrial y económico que podría ser utilizado para mejorar la nutrición humana. Sin embargo, es un cultivo en el cual es necesario el mejoramiento agronómico para su reintroducción a gran escala (Feine, et al., 1979). El cultivo de tejidos vegetales puede acelerar el proceso de mejoramiento y selección de plantas, ya que actualmente se ha desarrollado una extensa gama de aplicaciones prácticas, entre las cuales se encuentran: la micropropagación (Murashige, 1979); rescate de la variabilidad genética preexistente (López, 1989), o bien aumentar esta variabilidad, e incluso crearla (variación somaclonal) (Krizek, 1984); inducción de líneas celulares resistentes a algún tipo de estrés con la finalidad de regenerar plantas (López, 1989); asimismo, estudiar los procesos celulares involucrados en las respuestas a algún tipo de estrés de las plantas, principalmente hídrico y salino (Bressan, 1982; Handa et al., 1982 y 1983; Handa, S., et al., 1983). Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales son un modelo perfecto para estudios de fenómenos morfogénéticos, ya que la característica de totipotencia de las células vegetales se puede aprovechar, teóricamente es factible dirigir las respuestas morfogénéticas (Tran Thanh

Van, 1981), con un manejo adecuado de diferentes combinaciones y concentraciones hormonales y otros factores ambientales y nutricionales. Por otra parte el cultivo de callos y de células en suspensión ha ayudado en la selección, evaluación y caracterización de líneas celulares y se ha demostrado que las células acumulan una serie de solutos orgánicos de manera distinta a lo largo del ciclo de crecimiento, dependiendo de las condiciones del medio ambiente, físicas y nutricionales. Sin embargo, es necesario establecer o adaptar las técnicas de cuantificación de metabolitos que se han usado en otras especies o en plantas in vivo para el estudio in vitro del Amarantho, donde se requiere una mayor sensibilidad de la técnica, debido a las pequeñas cantidades de material (células) disponible. Existen pocos reportes publicados sobre el crecimiento in vitro y respuestas morfo genéticas en los miembros de la familia Amaranthaceae, por lo que es necesario todavía investigar y optimizar los sistemas para el estudio in vitro del Amarantho, ya que en recientes años se ha estudiado a nivel agronómico principalmente.

En el presente trabajo se pretende colaborar al estudio in vitro del Amarantho estableciendo las bases metodológicas para el estudio morfo genético y fisiológico de callos y células en suspensión de A. cruentus y A. hypochondriacus.

En esta investigación se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL:

Establecer las bases metodológicas para el estudio del cultivo in vitro de Amaranthus cruentus L. y A. hypochondriacus L.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. *Establecer la metodología para el cultivo in vitro de Amaranthus cruentus L. y A. hypochondriacus L.*
 - 1.1 *Cultivo de callos.*
 - 1.2 *Cultivo de células en suspensión.*
 - 1.3 *Cinéticas de crecimiento en callos.*
 - 1.4 *Cinéticas de crecimiento de células en suspensión.*
 - 1.5 *Rediferenciación del cultivo de callos por vía organogénesis.*
 - 1.6 *Rediferenciación del cultivo de callos por vía embriogénesis.*

2. *Establecer la metodología para cuantificar algunos metabolitos (o solutos orgánicos) en el cultivo in vitro de Amaranthus cruentus L. y A. hypochondriacus L.*
 - 2.1 *Cuantificar la acumulación de los siguientes metabolitos: aminoácidos totales, amarantina, aminos cuaternarias, glicina betaina, proteínas, nitratos, reductores totales y sacarosa, durante el ciclo de crecimiento de callos y células en suspensión de Amaranthus cruentus L. y A. hypochondriacus L.*

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES DEL AMARANTO.

2.1.1 HISTORIA.

La semilla de amaranto fue uno de los alimentos básicos casi tan importante como el maíz, el frijol y la chía en la época precolombina. Cerca de 20,000 Ton. de grano de amaranto eran el tributo anual al emperador Azteca Moctezuma (National Research Council, 1984; Granados y López, 1986). El amaranto, también llamado 'huahutli' o 'alegría', formaba parte de su dieta. La planta tierna la comían como verdura y con las semillas preparaban atole, tamales y dulce (Alejandre y Gómez, 1986), además de ser un elemento capital en la religión (Tucker, 1986). Cuando el Imperio Azteca fue invadido por los conquistadores españoles, éstos prohibieron el uso del amaranto, lo que lo llevó al desuso, a pesar de haber sido la planta ceremonial más importante para los Aztecas.

2.1.2 TAXONOMIA.

Desde el punto de vista taxonómico la familia Amaranthaceae, del orden Caryophyllales, se considera un grupo complicado. Se han intentado diferenciar las especies con base en la pigmentación de la planta y por la forma de crecimiento, pero debido a que la pigmentación es un carácter segregado entre poblaciones y dada la plasticidad de la forma de crecimiento que depende de variables ambientales, este tipo de criterios no tiene validez taxonómica (Mapes, 1986). El género *Amaranthus* spp incluye todas las plantas domesticadas; productoras de grano y hojas y las que han sido utilizadas para la extracción de colorantes, para ornamento, y las malezas más comunes. Este género contiene alrededor de 60 especies ampliamente distribuidas en las regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo. El Amaranto es una planta herbácea anual que puede llegar a medir entre 1.5 y 2 m. de altura, o bien puede ser postrada. Sus hojas son

peciolado-ovaladas y su color así como el de los tallos va de verde a rojo, sus inflorescencias son largas, terminales, indeterminadas o forman una panoja piramidal. Los amarantos son monóicos y autofértiles, cada una de las cimas de la inflorescencia se inicia con una flor estaminada simple seguida por un número indefinido de flores pistiladas, cada flor forma una capsulita que abre transversalmente y contiene una semilla de entre 0.9 y 1.7 mm de diámetro que va desde el color blanco hasta negro (National Research Council, 1984; Alejandre y Gómez, 1986, 1986a; Granados y López, 1986).

2.1.3 DISTRIBUCION Y ECOLOGIA.

El amaranto ha sido cultivado en gran variedad de ambientes, desde tierras tropicales hasta semiáridas y desde el nivel del mar hasta algunos de los lugares más altos del mundo. Además los ecotipos han desarrollado tolerancia tanto a suelos alcalinos como ácidos (National Research Council, 1984). Las zonas de México donde se le cultiva tienen características altitudinales muy contrastantes, pues lo mismo se encuentra a 100 msnm que a 2,800 msnm (Sierra Madre Occidental; Llanura Costera del Golfo de California y del Pacífico; Antiplanicie Mexicana; y Sierra Madre del Sur), (Reyna, 1986). Latitudinalmente también se distribuye ampliamente de los 10° N a los 28° N (Reyna, 1986). En cuanto a temperatura, se ha observado que las plantas crecen mejor cuando los días presentan temperaturas altas por lo menos de 21°C. En México han mostrado buen desarrollo en lugares muy cálidos (29°C) y uniformes todo el año como en Atoyac, Gro., hasta localidades templadas como Tulyehualco y Milpa Alta con temperatura media anual de 14°C, inviernos definidos y presencia de heladas tempranas que afectan principalmente al follaje, pero poco a la semilla (Reyna, 1986). Las semillas requieren de un suelo muy húmedo durante la germinación y establecimiento de las raíces, una vez establecidas las plántulas, los amarantos productores de semilla crecen bien con poca agua, de hecho crecen mejor bajo condiciones de sequía (desde 200 mm anuales) y condiciones calurosas, por otro lado los amarantos utilizados como vegetales requieren más agua durante la época de crecimiento (National Research Council 1984).

En México se cultiva en condiciones de temporal, aun en sitios con menos de 400 mm de lluvia al año, o bien, en zonas donde la precipitación es abundante superior a los 1,300 mm (Reyna, 1986). Respecto al suelo, las plantas de amaranto para semilla requieren de sitios con buen drenaje y prefieren los suelos neutrales o básicos, en cambio los amarantos para hortaliza crecen bien en condiciones especialmente ácidas. Además se ha observado que el amaranto crece bien en suelos con una alta variación de nutrientes, estas plantas absorben principalmente grandes cantidades de nitrógeno (Grubben y Slotte, 1979; National Research Council, 1984; Orea y Trinidad, 1986), el porcentaje de proteína se eleva conforme aumenta la fertilización nitrogenada alcanzando en hojas valores del 27% y 16% en la planta completa (Orea y Trinidad, 1986). También se obtiene respuesta aunque menor, al aplicar fósforo como fertilizante (Morales, *et al.*, 1986; Orea y Trinidad, 1986). Existen algunas variedades que presentan tolerancia a altas concentraciones de sal, alcalinidad, aluminio, etc. (National Research Council, 1984). Las zonas actuales de producción de amaranto en México son el Distrito Federal, Edo. de México y Morelos como los productores más importantes, también se reporta su cultivo en pequeñas superficies de Michoacán, Jalisco, Sonora, Chihuahua, Sinaloa, Durango, Guerrero, Tlaxcala, Puebla y Oaxaca (Alejandro y Gómez, 1986; Reyna, 1986; Sánchez Marroquín, 1986).

2.1.4 FISILOGÍA.

El amaranto es una de las especies no gramíneas que realiza fotosíntesis por la ruta C_4 , lo que le permite mantener una tasa fotosintética más alta que las plantas que realizan fotosíntesis por la ruta C_3 bajo las mismas condiciones de déficit de agua y bajo una alta intensidad de luz y altas temperaturas, produciendo de esta manera más biomasa que las plantas que fijan carbono en forma C_3 , (Ciclo de Calvin) (Bidwell, 1979; Salisbury y Ross, 1985; Reyna, 1986; Tucker, 1986). Esta es una de las razones por la cual el amaranto puede ser un cultivo económicamente atractivo en regiones calientes y secas donde otros cultivos no prosperan. Otra característica de

algunos amarantos es que son sensibles a la longitud del día en la floración y ésta puede darse prematura, tardía, o bien, puede no presentarse dependiendo del fotoperiodo (National Research Council, 1984; Suárez, 1986; Tisserat y Galletta, 1988).

2.1.5 PRODUCCION

El cultivo del amaranto varía dependiendo de la zona, pero en general puede ser de 2 formas: directamente plantando la semilla en el campo o indirectamente pasando primero por un almácigo y posteriormente trasplantándolo al campo (Espitia, 1986; Gómez, 1986). Una vez establecido el cultivo, su mantenimiento es relativamente fácil. La densidad de cultivo no ha sido aún bien estudiada, pero la elección depende del método de cosecha, generalmente los cultivos de A. cruentus y A. hypochondriacus presentan 320,000 plantas/ha, sin embargo, es posible encontrar zonas con una densidad desde 80,000 plantas/ha (National Research Council, 1984; Espitia, 1986). Las siembras actuales se están haciendo con variedades criollas, las cuales presentan una alta variabilidad genética (Alejandre y Gómez 1986a y 1986c). El rendimiento de grano generalmente va de 1,000 - 2,000 kg/ha aunque algunas veces se ha llegado a un rendimiento de 6,000 kg/ha (Weber, 1986), en cuanto a la producción de hojas (para verdura) va de 4-14 Ton/ha. Sin embargo, se ha reportado tan alta como 40 Ton/ha (National Research Council, 1984). El ciclo de vida va desde plantas que maduran de los 2 hasta los 6 meses, aunque la mayoría lo hacen a los 5.2 meses.

2.1.6 PLAGAS Y ENFERMEDADES.

En las especies de amaranto se encuentran diferentes grados de susceptibilidad a las plagas y enfermedades. La plaga de mayor importancia en el cultivo de amaranto en México es el barrenador de tallo de especie no identificada, cuyo daño puede ser bastante severo (Espitia, 1986). Otras plagas son las chinches Ligus lineolaris y el barrenador de tallo Lixus trunculatus, además de plagas secundarias como Phymenia recurvalis, Cletus

sp. y *Aspavia* sp., junto con los nemátodos *Meloidogine incognita* y *Nacobbus aberrans* (García, 1967; Grubben y Sloten, 1979; National Research Council, 1984; Espitia, 1986; Santacruz y Marban, 1986). Entre las principales enfermedades se encuentran: la pudrición de cuello causada por el complejo de hongos *Fusarium* sp, *Pythium* sp y *Rhizotocnia* sp; la causada por *Pythium aphanidermatum*; y la roya blanca causada por *Albugo blitii*, entre otras (García, 1967).

2.1.7 COMPOSICION FISICA Y QUIMICA DE SEMILLAS Y HOJAS.

Las especies de amaranto pertenecen al grupo de los pseudocereales, con este nombre se designan a las semillas de plantas dicotiledóneas ricas principalmente en harina, pero también en proteínas. Las semillas de amaranto presentan alrededor de 16% de proteínas, lo cual se puede comparar con las variedades convencionales de trigo (12-14%), arroz (7-10%), maíz (9-10%), entre otros (National Research Council, 1984), pero lo más importante es la calidad poco usual de su proteína, ya que tiene casi 2 veces el contenido de lisina comparada con la que se presenta en otros cereales (arroz, trigo, maíz, etc.), de hecho tiene tanta como la leche, sin embargo, es deficiente en leucina, pero este aminoácido es abundante en otras plantas convencionales usadas como fuente de proteína (National Research Council, 1984). El germen y salvado constituyen el 26% de la semilla; la harina el 74%, muy similar al grano de trigo. En la fracción germen-salvado, existe concentración significativa de proteínas, vitaminas, grasas y minerales. El germen contiene 30% de proteína y 20% de aceite, los gránulos de almidón tienen una alta capacidad de absorción de agua, por lo cual puede tener muchas aplicaciones en la industria (National Research Council, 1984). Las hojas de amaranto que son usadas para consumo humano o forraje presentan una notable cantidad de hierro, calcio, así como niveles altos de proteínas, (30% del peso seco), con niveles altos de aminoácidos esenciales: lisina y metionina, además de ser una fuente de vitamina A, vitamina B, ácido ascórbico, riboflavina, ácido fólico (National Research Council, 1984; Sánchez-Marroquín, 1986). Factores no nutritivos también se encuentran

en el amaranto, tales como las saponinas, inhibidores de tripsina, taninos, nitratos y oxalatos, pero en niveles similares a los que se encuentran en legumbres y granos comúnmente usados (National Research Council, 1984). En las hojas de amaranto también altas concentraciones de amarantina, colorante que pertenece al grupo de las betalainas que producen el color rojo-violeta en las Centrospermae, su estructura consiste en un cromatóforo, uno ó más fenoles adheridos a uno de los azúcares. La amarantina es sintetizada bajo diferentes condiciones tales como: reguladores de crecimiento como las citocininas, luz y bajo estrés hídrico. La función de la amarantina en las plantas aún no se ha establecido. Las betalainas, especialmente las betacianinas (incluye la amarantina) han recibido mucha atención durante la última década debido a su amplio uso como colorante en la industria alimenticia y con el fin de estudiar los factores que afectan su estabilidad, tales como el valor del pH, temperatura, oxígeno, luz y agua. (Berlín, et al., 1986; Von Elbe, 1986).

2.2 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

2.2.1 HISTORIA.

A principios del siglo XX Haberlandt por primera vez tomó en cuenta la totipotencialidad de las células vegetales y propuso que el cultivo de tejidos vegetales (CTV) podría ser un modelo adecuado para estudiar los fenómenos de morfogénesis, proporcionando información sobre las interrelaciones e influencias a las que están sometidos los vegetales. Durante las siguientes tres décadas, fueron pocos los progresos que se obtuvieron en el campo. A partir de 1934 se obtuvieron grandes avances en el desarrollo de medios de cultivo, se incorporaron auxinas y vitaminas y se desarrollaron metodologías para el cultivo de callos y órganos de muchas especies (Street, 1977). En la década de los 50 se llevaron a cabo bastantes estudios en cuanto a los factores que controlan la diferenciación del tejido vascular, como la influencia de la relación auxina-citocininas en el tipo de crecimiento y morfogénesis (Skoog y Miller, 1967). A partir de la década de los 60 las

técnicas del CTV han tomado gran ímpetu, lo que ha llevado al desarrollo de técnicas altamente especializadas para diferentes tipos de cultivo (órganos, células aisladas, células en suspensión, callos, tejidos, embriones, protoplastos y criopreservación). Durante esta última década se han utilizado las características y propiedades del cultivo en otras áreas además de la morfogénesis, tales como la fisiología, bioquímica, genética, fitomejoramiento y fisiología vegetal (Thorpe, 1978), sin embargo, aún no se ha obtenido un control perfecto de la morfogénesis *in vitro* (Iran Thanh Van, 1981), se menciona que para esto no sólo es necesario estudiar partes y procesos aislados, sino unificarlos y observar los diferentes comportamientos.

2.2.2 ESTABLECIMIENTO.

Las metodologías en CTV se han desarrollado grandemente, así como la tecnología y variedades vegetales que se han cultivado. Virtualmente cualquier parte de la planta puede ser cultivada *in vitro* con relativo éxito. Sin embargo, la elección del explante dependería de los propósitos específicos de cada investigación. Evans *et al.*, (1981) señala que la edad fisiológica y ontológica del explante pueden ser críticos en las características regenerativas y en el grado de diferenciación. También se ha mencionado que la interrelación entre las células, el medio de cultivo y la atmósfera pueden modificar los patrones morfogenéticos (Street, 1977; Thorpe, 1978). Se han establecido 3 estados en la secuencia de establecimiento del CTV. (Murashige, 1974):

- I. Establecimiento del cultivo en condiciones asépticas, abarca desde selección del explante hasta la obtención de nuevas células y su proliferación.
- II. Multiplicación de propágulos mediante subcultivos, incrementando el tamaño y número de estructuras e induciendo la formación de novo de órganos y yemas.
- III. Adaptación paulatina de plantas regeneradas en invernadero y en campo.

Para cada una de las etapas es necesario optimizar condiciones físicas y fisiológicas del explante, condiciones fisicoquímicas del medio y factores ambientales. Así el explante que va a ser cultivado *in vitro* deberá ser provisto de varios elementos. La diferencia entre los medios nutritivos va a depender de la fuente del explante y los resultados a los que se pretenda llegar, esta selección del medio debe determinarse empírica y experimentalmente. La composición de los medios de cultivo va a variar en las concentraciones de las sales minerales (macro y microelementos), sustancias orgánicas (vitaminas y aminoácidos), fitohormonas (auxinas, citocininas, giberelinas), fuente de carbono (sacarosa), otros derivados orgánicos (extractos y jugos), y antioxidantes (ácido ascórbico, carbón activado, etc.). Además de los factores químicos antes mencionados, es necesario optimizar factores físicos como: pH, luz (intensidad, cantidad y calidad), temperatura, y estado físico del medio de cultivo (sólido, semilíquido y líquido). Todos los reactivos usados deben tener un alto grado de pureza (Q.P) para evitar alteraciones en la concentración real empleada, además todos los recipientes, instrumentos y material vegetal deberán esterilizarse al igual que los medios de cultivo. Los métodos de esterilización más frecuentes son el calor húmedo, ultrafiltración y químico.

2.2.3 FITOHORMONAS.

La mayoría de los cultivos vegetales requieren para su desarrollo a las fitohormonas u hormonas, las cuales son sustancias químicas sintetizadas en muy pequeñas cantidades en ciertos tejidos, y en ocasiones trasladados a otra parte del organismo donde ejercen su acción. Intervienen en múltiples fenómenos fisiológicos, bioquímicos y en el desarrollo de las plantas, ya sea activando, inhibiendo o modificando algún proceso. Las fitohormonas pueden ser endógenas o sintéticas, actualmente se conoce su acción cuantitativa más que la cualitativa durante la regulación de la morfogénesis. Las fitohormonas que se utilizan frecuentemente en el CTV son: las auxinas, citocininas y giberelinas.

Las auxinas son compuestos formados por un grupo indol. Todas las plantas sintetizan auxinas, principalmente en sus partes jóvenes (ápices, frutos, hojas en desarrollo, etc.). El ácido indolacético (AIA) es una auxina endógena, auxinas sintéticas son el ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4 diclorofenoacético (2,4-D), etc. La auxina tiene efectos en el crecimiento celular, esto se debe al aumento consecutivo de la plasticidad en la pared celular, causando la relajación de su estructura de modo que posibilita el crecimiento plástico, provocando que se deslicen las fibrillas de la célula para que se agreguen otras nuevas, después hay una penetración de agua que provoca que la célula se alargue, de esta manera actúa la auxina sobre las paredes celulares más que sobre mecanismos genéticos o bioquímicos. (Bidwell, 1979; Goodwin y Mercer, 1986). Tienen efecto sobre las síntesis del RNA y de proteínas indicando que durante el proceso de crecimiento es necesaria una continua síntesis proteica. Estimulan la división celular en las células de origen cambial que conduce a las células a formar callos. Tiene acción en las reacciones de crecimiento (tropismos) y en las correlaciones entre órganos, en especial en el fenómeno de dominancia apical. Retarda la caída de las hojas y los frutos. Tiene una clara acción rizógena (Skoog y Miller, 1967; Jankiewicz, 1989; Goodwin y Mercer, 1986). Una de las diferencias entre las auxinas naturales y las sintéticas, es que estas últimas son más estables debido quizá a que hay pocos sistemas enzimáticos que los atacan, por lo tanto se acumulan más fácilmente e intoxican a la planta. Una dificultad para los experimentos con las auxinas endógenas es que son inactivadas muy rápido en la mayoría de los tejidos. El transporte de las auxinas es principalmente basipétalo, del ápice hacia la base de la planta. (Bidwell, 1979, Goodwin y Mercer, 1986; Jankiewicz, 1989). Aún no se conoce como actúa la auxina, algunos investigadores han manifestado la existencia de receptores auxínicos, ya sean citoplasmáticos o de membrana. Es posible que la asociación auxina-receptor dé como resultado la hormona activa. (Goodwin y Mercer, 1986).

Las citocininas son compuestos derivados de la adenina, se sintetizan principalmente en las raíces, se conocen 2 compuestos endógenos: la zeatina (Z) y el isopenteniladenina (IPA), los compuestos sintéticos más usados son:

la cinetina (K) y la benciladenina (BA). Las citocininas son muy activas y presentan numerosas acciones siendo las principales: Un efecto en la división celular, en este proceso son indispensables, pero ineficaces en ausencia de auxina; las dos se complementan, la auxina favorece la duplicación del DNA y la citocinina hace posible la separación de los cromosomas. Un papel muy claro en la organogénesis, en la que brindan estimulación considerable a la formación de yemas, y son antagonicas a rizogénesis. Favorecen la síntesis proteica, se han observado citocininas en la composición del RNA que participan en esta síntesis, por otra parte protegen a los metabolitos de las acciones de las enzimas hidrolíticas. Este efecto causa un retraso de la senescencia. Intervienen en la formación de flores y frutos bajo ciertas circunstancias, probablemente inducen las primeras fases de embriogénesis somática, induce el transporte, acumulación y reserva de metabolitos. (Wain y Fawcett, 1969; Bidwell, 1979; Tran Thanh Van, 1981; Goodwin y Mercer, 1986; JanKierwicz, 1989). El transporte de las citocininas es basipétalo y acropétalo, se mueven con cierta lentitud comparada con las auxinas y las giberelinas.

Las giberelinas, se han encontrado en hongos y en todas las plantas, se producen en las partes jóvenes. Todas tienen la misma estructura anillada básica derivada de la síntesis de los isopropenoides. Las giberelinas parecen sintetizarse en muchas partes de la planta, pero más especialmente en las áreas en crecimiento activo. Las fuentes más ricas y abundantes son las raíces y frutos jóvenes, especialmente semillas. Sus principales acciones en el alargamiento de los entrenudos; sin embargo, esto sólo afecta algunas especies, en especial las enanas que pueden lograr un tamaño normal después de una aplicación de AG₁. Esta acción también puede presentarse en los pedúnculos florales, lo que permite una precocidad o bien, inflorescencias más desarrolladas. En el cultivo *in vitro*, las giberelinas son activas en numerosos meristemas que, en su ausencia, presentan un aspecto globulosos debido a la acumulación de nudos. También favorecen la síntesis de enzimas hidrolíticas. Las giberelinas también actúan sobre la cantidad de auxina que frecuentemente aumenta, ya sea por estimulación de la síntesis o por inhibición de las auxinas-oxidasas. Tiene una acción en la floración, en unas

especies infibiéndola y en otras estimulándola. También actúan en el desarrollo de frutos partenocárpicos. Intervienen en fenómenos de liberación de la dormancia de semillas y/o yemas. En el campo de la organogénesis, las giberelinas tienen acciones antagónicas: parece que se oponen al fenómeno de la dediferenciación, en el cultivo de tejidos podría usarse esto en los explantes organizados (meristemos, ápices y yemas). (Tran Thanh Van, 1981; Bidwell, 1979; Salisbury, 1985; Goodwin y Mercer, 1986; Jankiewicz, 1989). Las giberelinas se mueven con mucha rapidez a través de la planta sin restricción aparente.

2.2.4 CULTIVO DE CALLOS.

Los callos son una masa amorfa de células que proliferan continuamente a partir de un explante. Hasta antes de la década de los 60, no se conocía mucho de la génesis y desarrollo de este tejido, ahora se sabe que es el resultado de la actividad mitótica de un grupo de células situadas en la superficie del explante. Frecuentemente su composición celular es heterogénea, dependiendo del origen del explante, edad del cultivo, y composición del medio, siendo esto en algunos casos, una característica indeseable en el CTV (Dodds y Roberts, 1982). Además pueden haber diferentes tipos morfológicos de callos, éstos varían de acuerdo a la apariencia exterior, textura, composición celular. La pigmentación del callo también es variable debido a la presencia de clorofilas, carotenoides, betalainas, flavonoides, etc., la clase y grado de pigmentación se ve generalmente afectada por factores nutritivos y ambientales. El cultivo de callos presenta algunos inconvenientes debido a la gran actividad mitótica después de periodos de tiempo largos, estos cambios son sobretodo a nivel nuclear ocurriendo poliploidía, disminución del número de cromosomas, aberraciones cromosómicas. La frecuencia de estos cambios citológicos varía de especie a especie (Quintero, 1985). Sin embargo, es necesario que se conozcan y entiendan las condiciones y controles involucrados con estos cambios. La inestabilidad cromosómica de las células en cultivo y la heterogeneidad celular son los principales obstáculos para el uso de callos en

estudios morfogénéticos, bioquímicos, mejoramiento, propagación, etc. No obstante los estudios con cultivos de callos han llevado al conocimiento de algunos de los factores que son importantes para la determinación del patrón de diferenciación celular (Quintero, 1985).

2.2.5 CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION

El cultivo de células en suspensión se obtiene directamente a partir de un inóculo (mesófilo de hoja, fragmento de cotiledón, etc.), o bien, transfiriendo un fragmento de callo al medio líquido el cual se mantiene en agitación constante (Narayanaswamy, 1977; Hurtado y Merino, 1987), después de un periodo de tiempo el cultivo estará compuesto por células aisladas o de pequeños agregados celulares de diversos tamaños, fragmentos residuales del inóculo y reminiscencias de células muertas (Narayanaswamy, 1977; Dodds y Roberts, 1982), etc. El cultivo se propaga transfiriendo alcuotas del cultivo a medio fresco, para la mayoría de los cultivos la densidad celular inicial está entre 0,5 a 2.5×10^3 cel/ml. Los cultivos de células en suspensión generalmente son heterogéneos, con células aisladas y agregados celulares. La proporción entre ambos, así como su tamaño, dependen de la especie vegetal de la cual se ha derivado el cultivo, edad, composición del medio y condiciones ambientales. En la mayoría de los cultivos el 60% de las células pueden estar aisladas o formar racimos de dos o tres células. La forma de las células en un mismo medio de cultivo va desde esféricas hasta cilíndricas. El riesgo de alteraciones genéticas es potencialmente mayor en el cultivo de células en suspensión que en el de callos, pudiéndose originar euploidías o aneuploidías (Narayanaswamy, 1977) en el material cromosómico de las células. A partir de células en suspensión puede inducirse la formación de embriones y órganos, aunque sólo se ha logrado en un número restringido de especies vegetales, principalmente herbáceas. Además también se ha usado el cultivo para estudios de bioquímica, fisiología, etc.

2.2.6 CINETICAS DE CRECIMIENTO.

Al iniciarse el cultivo de callos o de células en suspensión, el comportamiento que presenta su crecimiento es típicamente sigmoidal (Street, 1977; Dodds y Roberts, 1982). En el cultivo de tejidos *in vitro* las curvas de crecimiento se han utilizado con fines de predicción para el control de crecimiento, la división y metabolismo celulares. Sin embargo, para establecer un sistema adecuado de crecimiento, es necesario tomar en cuenta que la división del callo ó células sea en fracciones iguales, además de que cada fracción posea el mismo potencial de crecimiento y casi el mismo daño mecánico ocasionado a los tejidos, (Aitchison, *et al.*, 1977). El crecimiento se puede determinar por uno o varios de los siguientes parámetros: número de células, peso fresco, peso seco, volumen del paquete celular, cantidad de proteínas, cantidad de ADN, índice mitótico, acumulación de carbohidratos, etc. Para la mayoría de los cultivos la curva de crecimiento muestra cuatro fases: Fase lag o de reposo, donde el inóculo no presenta ninguna señal de división celular (Ngrayanaswamy, 1977; Dodds y Roberts, 1982), ya que únicamente se está adaptando a las nuevas condiciones nutricionales; Posteriormente se inicia e incrementa la velocidad de la división celular durante las fases exponencial y lineal. La velocidad de división va disminuyendo gradualmente hasta dar inicio a la fase estacionaria, que será el momento en que se hayan agotado los nutrientes.

En esta fase las células han alcanzado su máxima densidad celular, el número de células se mantiene más o menos constante hasta que el número comienza a disminuir por lisis celular. El crecimiento de las células también puede expresarse cualitativamente, pues conforme las células se multiplican se observará un aumento en la turbidez del medio de cultivo.

2.2.7 MORFOGENESIS.

La morfogénesis se refiere a los cambios estructurales de la célula individual o a la organización de células relacionadas con aspectos genéticos, fisiológicos o bioquímicos para formar tejidos, órganos y posteriormente una

planta completa. La capacidad de las células vegetales para regenerar plantas in vitro es una característica que ha sido aprovechada para la multiplicación masiva, así como el estudio de procesos morfogenéticos como la embriogénesis y organogénesis. Sin embargo la regeneración de plantas completas se enfrenta a muchos obstáculos como son las diferentes vías de morfogénesis, el limitado potencial morfogenético de algunos explantes, la alta incidencia de aberraciones, la baja ocurrencia de embriogénesis somática, disminución del potencial morfogenético a medida que aumentan los subcultivos, etc. (Thorpe, 1978). Existen dos rutas principales para el cultivo in vitro vía morfogénesis con fines de multiplicación y regeneración de plantas: una es indirecta y requiere la generación de callos en primer lugar; y otra directa que mantiene los elementos organizados del explante madre para inducir brotes adventicios. Es importante determinar la ruta a seguir de acuerdo a los objetivos con el fin de considerar las ventajas y desventajas de cada uno y poder sacarle provecho a la técnica. Con respecto a la morfogénesis del género Amaranthus se han hecho estudios tanto de inducción directa como indirecta (Cuadro 1), sin embargo, el tipo de explante, medio nutritivo, combinación y concentración hormonal usados en estos trabajos y la respuesta a éstos ha sido muy variada.

2.2.7.1 Organogénesis.

La organogénesis se puede dividir en 3 eventos principales (Aitchison et al., 1977): a) La inducción, que está dada por la activación del metabolismo celular permitiendo a las células utilizar los nutrientes presentes en el medio de cultivo, las dimensiones de las células son constantes, esto es seguido por; b) La división, que es una etapa de síntesis metabólica muy activa, disminuyendo el tamaño celular y aumentando las divisiones celulares de la capa periférica; c) La diferenciación, que consiste en la formación de un meristemóide el cual consiste de una agregación de células más pequeñas isodiamétricas, de pared más delgada, microvacuoladas, que eventualmente darán lugar a estructuras diferenciadas como primordios de órganos (brotes y raíces). Esau (1976) menciona que cambios cualitativos que promueven diferencias estructurales y funcionales en células, tejidos,

CUADRO 1. Cultivo *in vitro* de Amaranthus spp

Especie	Explante	Medio de cultivo ¹	Hormonas ²	Tipo de cultivo	Resultados	Referencia
<u>A. cruentus</u> <u>A. hypochondriacus</u> <u>A. tricolor</u>	Discos de hoja seg. de hipocótilos y cotiledones	Medio basal B ₂ y MS	2,4-D, AN(A, BA, Z	Callos, células en suspensión y aislamiento de protoplastos	Callos, embrioides, raíces anormales y adventicias, brotes de hipocótilos, en- raizamiento de plántulas, semillas	Flores et al., 1982
<u>A. hypochondriacus</u>	Yemas axilares, ápices	Medio basal CN y MS	ABA, AIA	Tejidas, órganos y el efecto de la mas miel de abeja y/o sacarosa	Desarrollo de ye- y el efecto de la mas axilares y ápices	Serrato y Vega 1986
<u>A. paniculatus</u>	segmentos de hipocótilos	Medio basal B ₂	GA ₃ , AN(A, 2,4-D, K, BA, Z	Callos	Callos, brotes di- rectos e indirectos, enraizamiento de plántulas, semillas	Pagga et al., 1987
<u>A. caudatus</u> <u>A. gangeticus</u> <u>A. hypochondriacus</u> <u>A. retroflexus</u> <u>A. viridis</u>	plántulas	Medio basal MS	AN(A, BA, ABA, GA ₃	Floración <i>in</i> <i>vitro</i>	Floración, semillas	Tissera y Galletta, 1988

1. Murashige & Skoog, 1962 (MS); Gamborg, et al., 1968 (B₂); Cresswell & Nitsch, 1975 (CN)
2. Intervalo de concentración hormonal: Z 0.003-3.0 mg/l¹; 2,4-D 0.01-10.0 mg/l¹; AN(A 0.01-0.01-5.0 mg/l¹; BA 0.01-0.5 mg/l¹; AIB 0.1 - 50.0 mg/l¹; AIA 0.1 - 5.0 mg/l¹; GA₃ 0.1 - 1.0 mg/l¹; K 0.5 - 1.0 mg/l¹

órganos y en la planta, involucran una división de trabajo entre las células, que las vuelve diferentes de sus precursores meristemáticos y de las demás células. El tipo más frecuente de morfogénesis, reportado en gran número de especies en tejidos vegetales, es la formación de raíces, pero en su mayoría esta organogénesis es tan esporádica que es difícil determinar las condiciones bioquímicas requeridas para su inducción.

2.2.7.2 Embriogénesis.

La embriogénesis somática ó asexual es otro proceso morfogenético mediante el cual se desarrolla un embrión a partir de una célula que no es producto de fusión gamética (Evans, *et al.*, 1981; Dodds y Roberts, 1982; Tisserat y Galleta, 1988).

En células en suspensión se ha observado que el desarrollo del embrión dentro del tejido se lleva a cabo por división transversal de una sola célula dando origen a dos células de diferente tamaño, la célula más grande se divide para formar el suspensor, la célula pequeña forma una pequeña masa pro-embriónica que pasa a través de varios pasos, forma globular, de corazón, torpedo y cotiledonaria, semejante a los que ocurren en la embriogénesis sexual. Las células embriónicas presentan doble polaridad, es decir, dos puntos opuestos de crecimiento a diferencia de la organogénesis que sólo presenta un eje de crecimiento. Algunos factores que pueden influir en el desarrollo de embriones son: el estado físico del medio (sólido, semisólido o líquido), fitohormonas, fuentes de carbono (Evans, *et al.*, 1981, 1983), carbón activado, etc. Sin embargo, la rediferenciación de callos o células a embriones somáticos es un evento poco frecuente aún.

MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

En este trabajo se utilizaron semillas de dos especies de amaranto: Amaranthus cruentus L. (T-21 Chapingo-V-86) (A.c.) y A. hypochondriacus L. var. mercado (153-5-3 Chapingo-V-87) (A.li.), de la colección del INIFAP, Chapingo, México. Toda la metodología se efectuó en las dos especies señaladas.

3.2 GERMINACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE LAS SEMILLAS.

Para la esterilización de las semillas primero se lavaron con agua corriente por 30 min., posteriormente se sumergieron en alcohol al 70% por un minuto, enseguida se probaron diferentes tratamientos de desinfección superficial que variaron en la concentración y tiempo expuestos a un bactericida (Microdyn) y/o a hipoclorito de sodio comercial (NaClO), Cloralex, (Cuadro 2), por último se enjuagaron 3 veces en agua destilada estéril y se sembraron en tubos de ensaye con vermiculita estéril. Para la evaluación de los tratamientos se tomó en cuenta: porcentaje de contaminación, tipo de contaminante (bacterias u hongos) y porcentaje de germinación.

3.3 MEDIOS DE CULTIVO BÁSICOS.

Durante la investigación se emplearon 3 medios básicos: Murashige y Skoog, 1962 (MS), Gamborg *et al.*, 1968 (B), y Schenk y Hildebrandt, 1972 (SH). En el cuadro A.1 (Apéndice A) se muestra la composición química de estos medios.

CUADRO 2. Tratamientos empleados para la esterilización de las semillas de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

Tratamientos	Bactericida *	Hipoclorito de sodio comercial **	
	Tiempo (min)	Tiempo (min)	Concentración (%)
1 a	0		
1 b	15	15	100
1 c	30		
2 a	0		
2 b	15	20	100
2 c	30		
3 a	0		
3 b	15	15	50
3 c	30		
4 a	0	20	50
4 b	15		
4 c	30		
5 a	0	15	20
5 b	15		
5 c	30		
6 a	0	20	20
6 b	15		
6 c	30		
7 a	0	0	0
7 b	15		
7 c	30		

* Bactericida = Microdyn concentración de 50 μ l / 100 ml de H₂O destilada.

** Hipoclorito de sodio comercial, Cloralex sin diluir = 100% (con 6% de cloro activo.)

3.4 PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO.

En la preparación de los medios de cultivo, todos los reactivos usados fueron de grado analítico de las marcas Merck, Sigma y Baker. Dependiendo de los objetivos de cada experimento, además de los medios básicos se

CUADRO 3. Tipo de hormonas e intervalos de concentraciones empleadas durante el cultivo de tejidos de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

Hormonas	Abreviatura	Concentración (mg/l)
Auxinas		
Acido 2,4 Dicloro fenoxiacético	2,4-D	0-20
Acido Naftalenacético	NA	0-10
Acido Indolacético	IA	0-10
Citocininas		
Cinetina (6-furfurilamino-purina)	K	0-20
Benciladenina	BA	0-20
Giberelinas		
Acido Giberélico (Giberelina A ₁)	GA ₁	0-10

adicionaron diferentes concentraciones y combinaciones de hormonas, (Cuadro 3). Los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas y con agua desionizada. La fuente de carbono que se uso en todos los medios, fue sacarosa (3.0%), además en los medios sólidos se adicionó agar (0.8%), por último, se ajustó el pH de los medios a 5.7 ± 1 con $\text{NaOH } 1 \text{ N}$. Los medios de cultivo se esterilizaron en una autoclave vertical a 120°C por 15 min. Para el medio sólido se usaron frascos de alimento infantil con 30 ml de medio o frascos de 45 ml con 10 ml de medio. Para el cultivo de células en suspensión de emplearon principalmente matraces Erlenmeyer de 125 ml y 150 ml con 30 ml y 60 ml de medio líquido respectivamente.

3.5 CONDICIONES AMBIENTALES DEL CULTIVO.

Tanto los cultivos sólidos como líquidos se mantuvieron en un cuarto de incubación a una temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ con luz blanca fría fluorescente y fotoperiodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad. Los

subcultivos se hicieron cada 4 semanas en medios sólidos y cada 3 semanas en medios líquidos, estos últimos se colocaron en agitación rotacional constante a 110 rpm.

3.6 SELECCION DEL EXPLANTE.

Se sembraron diferentes tipos de explantes tales como hipocótilos, hojas cotiledonarias y raíces de plántulas de diferentes edades, (7, 9 11 y 13 días) además de semillas, todos previamente esterilizados con el fin de inducir callo (Fig. 1). La selección del explante más apropiado para la inducción de callo se evaluó tomando en cuenta el tiempo que tardó cada explante en formar callo, así como la cantidad y friabilidad.

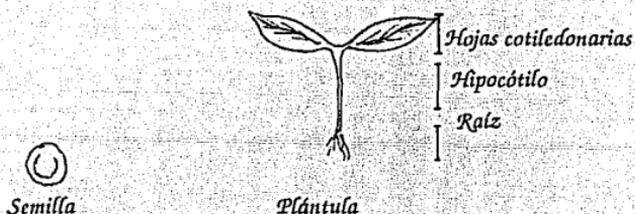


FIGURA 1. Tipo de explantes utilizados para la inducción de callos.

3.7 CULTIVO DE CALLOS.

3.7.1 INDUCCION DE CALLOS.

Para la inducción de callos se probaron 12 medios, donde se usaron los medios básicos MS, SH y B, más diferentes concentraciones y combinaciones hormonales, (Cuadro 4). Durante 8 semanas a partir de la siembra del explante se siguió el desarrollo del callo, las observaciones se hicieron cada

CUADRO 4. Tratamientos empleados en el estudio de diferentes medios básicos y de combinaciones y concentraciones hormonales para la inducción de callos en *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

Tratamientos	Medio básico			Hormonas (mg l ⁻¹)				
	MS	B ₂	SH	2.4-D	BA	K	GA ₃	ANA
1	χ			1.0	0.5			
2	χ			1.0		0.5		
3	χ			1.0		0.5	0.5	
4	χ			1.0		0.5		0.5
5		χ		1.0	0.5			
6		χ		1.0		0.5		
7		χ		1.0		0.5	0.5	
8		χ		1.0		0.5		0.5
9			χ	1.0	0.5			
10			χ	1.0		0.5		
11			χ	1.0		0.5	0.5	
12			χ	1.0		0.5		0.5

tercer día anotando cuando se inicia la formación de callo y el color, friabilidad y crecimiento del mismo. Para friabilidad y tamaño se asignaron valores arbitrarios, donde para máxima friabilidad, es decir, un callo fácilmente disgregable se le asignó el valor de 4χ (100%), 3χ (75%), 2χ (50%) y 1χ (25%) fueron valores de friabilidad para los callos menos disgregables o más compactos. En cuanto a crecimiento 4χ (100-75%) representa un crecimiento muy abundante, 3χ (75-50%) abundante, 2χ (50-25%) regular y 1χ (25-0%) escaso crecimiento.

3.7.2 PROLIFERACION Y MANTENIMIENTO DEL CALLO.

Con el objeto de definir el medio óptimo para la proliferación y mantenimiento del callo se usaron los medios que funcionaron mejor en la inducción de callos. Posteriormente ya seleccionado el mejor medio básico (SH), se probaron diferentes concentraciones de hormonas (2.4-D y BA)

CUADRO 5. Tratamientos empleados para determinar las combinaciones y concentraciones hormonales necesarias para la proliferación de callos de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

Tratamientos *	Hormonas (mg \cdot l $^{-1}$)	
	2,4-D	BA
9	1.0	0.5
9a	1.0	0
9b	0.5	0.5
9c	0.5	0
9d	0	0

* En todos los tratamientos se uso el medio básico SH.

(Cuadro 5). Para cuantificar el mejor medio en la proliferación de callo se siguió el crecimiento cinético celular en todos los tratamientos. Se partió de 0.5 g de callos friable (4x), que estuviera en la periferia y proveniente del mismo lote, es decir, de una misma planta. Se sembraron en frascos de 45 ml con 10 ml de medio. Se muestreo cada 3 días durante un mes, haciendo 5 repeticiones por tratamiento. Los parámetros de crecimiento usados fueron peso fresco y peso seco. El peso fresco se determinó directamente, simplemente separando el callo del medio de cultivo y pesándolo en una balanza analítica, a partir del peso fresco se cuantificó el peso seco colocándolo en una estufa a 80°C durante 24 hrs. o hasta que tuviera peso constante.

3.8 CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION

3.8.1 ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO.

Para el cultivo de células en suspensión se usaron los mismos medios que para la proliferación de callos pero sin agar (Cuadro 4). El cultivo se inició con la transferencia de callo friable (4x) a matraces de 125 ml con 30 ml de medio y se mantuvieron en agitación rotacional constante a 110 rpm.

Una vez que el cultivo de células estuvo estable se tamizaron las células con una malla de alambre (estéril) para eliminar los conglomerados celulares y obtener así un cultivo con un grado de dispersión 'adecuado'.

3.8.2 MANTENIMIENTO Y PROLIFERACION DEL CULTIVO DE CELULAS.

Para la selección del medio más adecuado para la proliferación y mantenimiento de células, se siguió la cinética de crecimiento celular. Así se transfirieron células en fase de aceleración negativa de cultivos ya establecidos a matraces de 125 ml con 30 ml de medio, iniciándose así el cultivo con una densidad de 0.25 g de células por cada 25 ml de medio. Cada 3 días durante un mes se tomaron 5 muestras para medir los parámetros de crecimiento los cuales fueron: peso fresco, peso seco, número de células y volumen del paquete celular. El peso fresco se cuantificó eliminando el medio por filtración al vacío con un embudo buchner y papel filtro Wattman no. 4 (Alvarado, 1990) y se pesó inmediatamente el conglomerado de células para evitar la deshidratación de las mismas. El peso seco se determinó igual que para callos. El número de células se determinó tomando 100 µl de cultivo de células y se contaron en el hemocitómetro. Para determinar el volumen del paquete celular, se midió en primer lugar el volumen total del medio líquido con las células en suspensión, posteriormente al filtrar las células del medio, se determinó el volumen del medio, y por diferencia se cuantificó el paquete celular. En las células en suspensión, además se hicieron pruebas de viabilidad durante la cinética de crecimiento. La metodología fue la siguiente: se colocaron 100 µl de células en suspensión con 10 µl de azul de Evan al 0.5% (Singer y McDaniel, 1986; Alvarado, 1990) y se contaron las células vivas, detectadas por el color azul, en el microscopio aproximadamente a los 5 min.

3.9 ORGANOGÉNESIS.

3.9.1 INDUCCIÓN, ELONGACION Y ENRAIZAMIENTO DE BROTES.

Para la iniciación de brotes se partió de callos de cuatro edades diferentes (2, 5, 7 y 14 meses), los tratamientos consistieron en el uso del medio básico ya seleccionado anteriormente para la proliferación de callo (SH), con modificaciones en la combinación y concentración hormonal (Cuadro 6). En este experimento se cuantificó el crecimiento, friabilidad y color del callo, además de la formación de estructuras organizadas como raíces y brotes. Se seleccionó el medio donde se formaron mayor número de brotes y más vigorosos (apreciación visual en cuanto a tamaño, color) para la inducción, posteriormente se probaron medios para el alargamiento de los brotes (Cuadro 7) y el enraizamiento (Cuadro 8).

CUADRO 6. Tratamientos empleados para determinar las concentraciones y combinaciones hormonales necesarias para la inducción de organogénesis en callos de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

Tratamientos *	Hormonas (mg/l)			
	BA	ANA	K	GA ₃
20	0.5			
21	1.0			
22	2.0			
23	0.5	0.5		
24	1.0	0.5		
25	2.0	0.5		
26		0.5	0.5	
27		0.5	1.0	
28		0.5	2.0	
29	0.5	0.5		0.1
30	1.0	0.5		0.1
31	2.0	0.5		0.1

* El medio básico en todos los tratamientos fue el SH

CUADRO 7. Tratamientos empleados para determinar las concentraciones hormonales y de sales del medio SH necesarias para inducir el alargamiento de brotes de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

Tratamientos	Sales SH %	Hormonas*		
		ANA	BA	GA ₁
32	100	x	x	
33	75	x	x	
34	50	x	x	
35	25	x	x	
36	100	x		x
37	75	x		x
38	50	x		x
39	25	x		x
40	100	x	x	x
41	75	x	x	x
42	50	x	x	x
43	25	x	x	x
44	100	x		
45	75	x		
46	50	x		
47	25	x		
48	100		x	x
49	75		x	x
50	50		x	x
51	25		x	x
52	100		x	
53	75		x	
54	50		x	
55	25		x	
56	100			x
57	75			x
58	50			x
59	25			x

* La concentración de ANA y GA₁ fue 0.5 mg/l¹ y de BA 1.0 mg/l¹

CUADRO 7. Tratamientos empleados para determinar las concentraciones hormonales y de sales del medio SH necesarias para inducir el alargamiento de brotes de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

Tratamientos	Sales SH %	Hormonas*		
		ANA	BA	GA,
32	100	x	x	
33	75	x	x	
34	50	x	x	
35	25	x	x	
36	100	x		x
37	75	x		x
38	50	x		x
39	25	x		x
40	100	x	x	x
41	75	x	x	x
42	50	x	x	x
43	25	x	x	x
44	100	x		
45	75	x		
46	50	x		
47	25	x		
48	100		x	x
49	75		x	x
50	50		x	x
51	25		x	x
52	100		x	
53	75		x	
54	50		x	
55	25		x	
56	100			x
57	75			x
58	50			x
59	25			x

* La concentración de ANA y GA, fue 0.5 mg/l¹ y de BA 1.0 mg/l¹

CUADRO 8. Tratamientos empleados para determinar el tipo y concentración de auxina necesaria para el enraizamiento *in vitro* de brotes de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

Tratamientos	Hormonas (mg/L)	
	AA	2,4-D
60	.	.
61	0.5	.
62	1.0	.
63	.	0.5
64	.	1.0

3.10 EMBRIOGENESIS SOMATICA.

3.10.1 INDUCCION.

Para la inducción de embriogénesis somática se utilizaron diferentes combinaciones y concentraciones hormonales (Cuadro 9). Se probaron callos de cuatro diferentes edades (2, 5, 7 y 14 meses). Los diferentes tratamientos consistieron en modificar el medio en cada subcultivo. Por un lado gradualmente se fueron disminuyendo auxinas y citocininas o por separado auxinas y citocininas, o bien se redujo drásticamente una de las dos hormonas, y la otra se disminuyó gradualmente, todo esto a partir del medio básico de mantenimiento previamente seleccionado. Para la evaluación de los tratamientos, se cuantificaron los cambios en la apariencia del callo (color, textura y crecimiento).

3.11 DETERMINACION DE METABOLITOS.

Esta parte experimental se llevó a cabo en el departamento de Bioquímica Vegetal de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Ezequiel Murillo García Φ .

CUADRO 9. *Tratamientos empleados para determinar las combinaciones y concentraciones hormonales sobre la inducción de embriones somáticos a partir de callos de A. cruentus y A. hypochondriacus.*

Tratamientos	Nº. de Subcultivo	Hormonas (mg l ⁻¹)	
		2,4-D	BA
A	1	0.75	0.40
	2	0.50	0.20
	3	0.25	0.10
	4	0.0	0.0
B	1	1.0	0.40
	2	1.0	0.20
	3	1.0	0.10
	4	1.0	0.0
C	1	0.75	0.50
	2	0.50	0.50
	3	0.25	0.50
	4	0.0	0.50
D	1	0.0	0.40
	2	0.0	0.20
	3	0.0	0.10
	4	0.0	0.0
E	1	0.75	0.0
	2	0.50	0.0
	3	0.25	0.0
	4	0.0	0.0

Con la finalidad de conocer la acumulación de algunos metabolitos (aminoácidos, amarantina, aminas cuaternarias, glicina betalana, reductores totales, sacarosa, proteínas totales y nitratos) durante el ciclo de crecimiento de ambas especies, se establecieron cinéticas de crecimiento de callos y células en suspensión, en las cuales se efectuaron muestreos cada 3 días durante un mes abarcando de esta forma todas las etapas del crecimiento celular.

3.11.1 PREPARACION DEL EXTRACTO.

El procedimiento que se siguió en la preparación del extracto de callos y células en suspensión para la determinación de metabolitos fue el siguiente: Se congeló una muestra no mayor de 3 g de callo o de células hasta el momento de hacer el extracto. Las muestras congeladas se molieron en un mortero (previamente congelado) hasta pulverizarlas. Posteriormente se agregó agua desionizada, se homogeneizó y se esperó a que se descongelara. Cada muestra se filtró con gasa y se centrifugó a 3000 rpm. para bajar los restos celulares. Después nuevamente se congelaron a -70°C hasta el momento de las determinaciones. La cuantificación de todos los metabolitos se hizo por técnicas colorimétricas.

3.11.2 DETERMINACION DE AMINOACIDOS TOTALES.

En un tubo de ensaye se agregaron 10 µl de muestra y se aforaron a 1 ml con agua desionizada, ésta se ajustó a un pH entre 5 y 7, después se agregó 1 ml de reactivo de ninhidrina (Apéndice B) y se puso a ebullición durante 30 min. Posteriormente se enfriaron las muestras en hielo y se agregaron 2.5 ml de etanol al 70%, por último se dejaron reposar 15 min. a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 570 nm. La curva estándar se hizo con ácido glutámico, (Coking, 1954).

3.11.3 DETERMINACION DE AMARANTINA.

En un tubo eppendorf se agregó 1 ml de muestra a la cual se le agregó ácido tricloroacético (TCA) para obtener una concentración final del 10%, se dejó reposar por 5 min. a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min., posteriormente al sobrenadante se le determinó la absorbancia a 537 nm.

3.11.4 DETERMINACION DE AMINAS CUATERNARIAS Y GLICINA BETAINA.

En un tubo de ensaye se agregó 1 ml de muestra y TCA hasta obtener

una concentración final del 10%, se agitó varias veces, y en seguida se eliminó el TCA con éter etílico (mínimo 3 veces) y con vacío. Las muestras posteriormente se neutralizaron con $\text{NaOH} \pm 1\text{N}$ a un pH de 7.0 ± 0.2 y se pusieron a secar en vasos de precipitado en una estufa con vacío a 80°C . Después se resuspendieron las muestras con 200 μl de agua desionizada, 100 μl se guardaron en el refrigerador (para cuantificar aminas cuaternarias) y 100 μl se pasaron por una columna de Dowvex 50 w (Apéndice B) la cual se lavó con agua y se eluyó con 4 ml de $\text{NH}_4\text{OH} 4\text{N}$, el eluido se puso a secar en la estufa con vacío a 80°C , enseguida se resuspendió la muestra con 100 μl de agua desionizada (para determinar glicina betaina). A cada muestra de 100 μl se agregó 1 ml de reactivo de Dragendorff (Apéndice B), se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 min., el sobrenadante se tiró y la pastilla se disolvió con 1 ml de $\text{KI} 2.45\text{N}$, por último se tomaron 10 μl se les agregó 1 ml de $\text{KI} 0.49\text{N}$, se leyó la absorbancia a 467nm. La curva estándar se hizo con glicina betaina, (Stumpf, 1984).

3.11.5 DETERMINACION DE NITRATOS.

En un tubo de ensaye se colocaron 100 μl de muestra más 400 μl de ácido salicílico (Apéndice B) al 5% y 10 ml de $\text{NaOH} 2\text{N}$. Durante todo el procedimiento los tubos permanecieron en hielo, ya que la reacción es altamente exotérmica, por último se agitaron cuidadosamente y se determinó la absorbancia a 410 nm. La curva patrón se hizo con KNO_3 (Cataldo, et al. 1975).

3.11.6 DETERMINACION DE PROTEINAS.

En un tubo de ensaye se colocaron 100 μl de muestra y se aforó a 1 ml con agua desionizada, a esto se agregaron 100 μl de desoxicolato de sodio (DOC) (0.15%) y se dejó 10 min. a temperatura ambiente, las muestras se enfriaron en hielo durante 5 min. y se añadió 100 μl de TCA al 72%, se dejaron 20 min. a 4°C , posteriormente se centrifugaron 5 min a 3000 rpm y se descartó el sobrenadante, a la pastilla se le agregó 1 ml de agua y 1 ml de reactivo A (Apéndice B), enseguida se dejó a temperatura ambiente 10 min.,

por último se agregaron 0.5 ml de reactivo B (Apéndice B) y se dejó 30 min. a temperatura ambiente. La absorbancia se determinó a 750 nm. La curva se hizo con albúmina bovina, (Peterson, 1977).

3.11.7 DETERMINACION DE REDUCTORES TOTALES (AZUCARES) Y SACAROSA.

En un tubo de ensaye se agregaron 20 μ l de muestra y se aforaron a 1 ml con agua desionizada, para la determinación de sacarosa antes de aforar se hidrolizó la muestra con HCl 1N, 5 min. a ebullición y se neutralizó con NaOH 1N. Posteriormente se agregaron 0.5 ml de reactivo I (Apéndice B) y se mantuvieron en agua hirviendo durante 20 min., enseguida se enfriaron a chorro de agua por 5 min. y se les agregó 0.5 ml del reactivo II (Apéndice B), después se agitó vigorosamente, por último se agregaron 8 ml de agua y se leyó la absorbancia a 520 nm. La curva estándar se hizo con sacarosa, (Manual de prácticas de Bioquímica I Facultad de Química, UNAM).

3.11.8 ANALISIS ESTADISTICO.

En esta investigación todos los diseños fueron completamente al azar con unidades experimentales homogéneas, el número de repeticiones varió dependiendo de cada experimento, pero como mínimo fueron 5 y máximo 25, cada tratamiento se repitió mínimo 3 veces. El análisis de varianza (ANAVA) se aplicó en los tratamientos para analizar la variabilidad de los tratamientos y la prueba de Tukey para la comparación de medias, en caso de presentarse variación en los tratamientos (Villafobos, et al., 1985; Hurtado y Merino, 1987).

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 CULTIVO IN VITRO DE *Amaranthus cruentus* L. Y *A. hypochondriacus* L.

4.1.1 ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO ASEPTICO Y SELECCION DEL EXPLANTE.

Como primer paso para tener éxito en el cultivo *in vitro* de cualquier especie es necesario el establecimiento de un cultivo aséptico, así como la selección del explante más apropiado. El establecimiento del cultivo aséptico es necesario ya que las plantas generalmente están contaminadas por un elevado rango de microorganismos que en condiciones normales pueden no ser patógenos, pero cuando se cultivan en condiciones *in vitro* la presencia de estos microorganismos es indeseable, ya que su tiempo de multiplicación es más rápido que el de las células vegetales, llegando a limitar el crecimiento de estas últimas, debido a que al crecer rápidamente los microorganismos agotan los nutrientes del medio, así como el espacio disponible, además de que hay la posibilidad de que liberen algunos productos de su metabolismo los cuales podrían ser tóxicos para el material vegetal. Para no causar daño al explante con la desinfección, generalmente se emplean porciones provenientes de plántulas que se germinaron en condiciones de asepsia, de esta manera casi se evita la contaminación. Para la esterilización de las semillas se eligió el tratamiento que presentó la menor proporción de contaminación, y que casi no afectó el porcentaje de germinación, ya que al ocurrir esto las plántulas que llegaban a crecer eran más débiles en comparación con las de los otros tratamientos. Los agentes desinfectantes que se usaron se seleccionaron de acuerdo a su disponibilidad y a la facilidad que presentaban para ser removidos.

El porcentaje de contaminación y de germinación de los diferentes tratamientos (Cuadros 2; A.2) usados para la esterilización de las semillas de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* fue principalmente de tipo bacteriano, aunque también se presentó contaminación por hongos en los tratamientos 5,

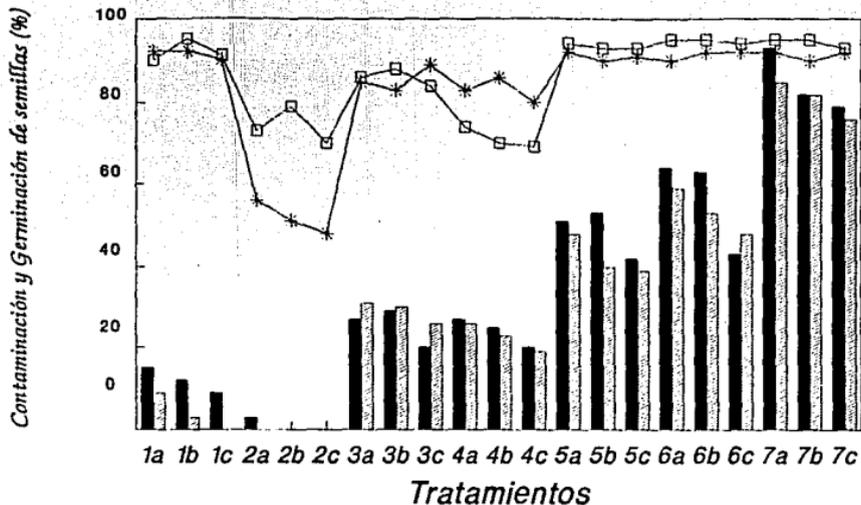


Fig. 2. Porcentaje de contaminación (■ *A. cruentus*; □ *A. hypochondriacus*) y germinación (* *A. cruentus*; + *A. hypochondriacus*) de semillas sometidas a diferentes tratamientos de esterilización. En la figura se muestra la media de los valores obtenidos.

6 y 7 a, b y c, donde el hipoclorito de sodio comercial se diluyó. Por tal razón fue necesario usar el hipoclorito sin diluir (Cloralex al 100%). El porcentaje de contaminación en condiciones normales fue del 92% para *A. cruentus* y del 95% para *A. hypochondriacus*, pero al usar Cloralex al 100% durante 20 min. en los tratamientos 2a, b y c disminuyó notablemente el porcentaje de germinación, en cambio en el tratamiento 1a, b y c con 15 min. en Cloralex a la misma concentración no afectó tanto a la germinación (Fig. 2; Cuadro A.2). Por lo tanto con base a estos resultados para la esterilización de las semillas de ambas especies de Amarantho se decidió usar el tratamiento 1c (Fig. 3), donde el agua se uso para remover las partículas más superficiales que rodeaban a las semillas, el alcohol al 70% se uso con la finalidad de romper la tensión superficial facilitando la penetración del agente bactericida y del hipoclorito de sodio comercial para atacar los microorganismos, y por último el enjuague con agua estéril para evitar que la germinación se viera afectada por restos de los agentes desinfectantes, este tratamiento casi no afecta la germinación y el porcentaje de contaminación fue del 9% para *A. cruentus* y de 0% para *A. hypochondriacus*.

Debido a que el tipo de explante puede ser un factor que determine la respuesta favorable o no en el cultivo de tejidos se hizo primero una selección del más apropiado, ya que al separar un segmento cualquiera de la planta (explante) y colocarlo en un medio de cultivo de composición química relativamente simple, es factible observar diferentes tipos de respuestas y a partir de esta fuente de material vegetal estará determinado el éxito del establecimiento del cultivo.

Para la selección del explante más apropiado para la inducción de callo se compararon 4 diferentes fuentes de células con base en la literatura de Amarantho (Cuadro 1), raíces, hipocótilos y hojas cotiledonarias, provenientes de plántulas de 7, 9, 11 y 13 días posgerminación y directamente colocando las semillas en el medio de inducción, ya que el embrión no se puede separar de las demás partes de la semilla. Además han logrado establecer cultivos a partir de una gran variedad de explantes (Evans *et al.*, 1981; Narayanaswamy, 1977; Tran Thanh Van, 1981), sin embargo,

Semilla de <i>A. cruentus</i> o <i>A. hypochondriacus</i>	
Lavar con agua corriente	30 min.
Lavar con alcohol al 70%	1 min.
Lavar con bactericida (Microdyn)	30 min.
Lavar con hipoclorito de sodio (Cloralex)	15 min.
Enjuagar con agua destilada estéril	3 veces
Sembrar en condiciones de asepsia en tubos de ensaye con vermiculita estéril.	

FIGURA 3. Metodología de esterilización para las semillas de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

la respuesta de éstos varía, de manera que debe elegirse el que presente las características que vayan de acuerdo a los propósitos que se quieren investigar (Caplin, 1963). Se ha mencionado que en ocasiones algunos tejidos cultivados *in vitro* crecen con mayor facilidad que otros de acuerdo a una variación, ya sea, respecto a la naturaleza y grado de diferenciación entre los diferentes explantes, generalmente la facilidad del cultivo de células disminuye con el aumento de la edad de la planta (Wareing y Al-Chalabi, 1985). En este trabajo se observó que a menor edad del explante la inducción de callo fue más rápida, independientemente del tipo de explante, por lo que se decidió seguir haciendo las pruebas con los explantes de plántulas de 7 días de edad, la respuesta a la inducción de callo fue diferente dependiendo del tipo de explante (Cuadro 10). Las hojas cotiledonarias fueron las primeras en iniciar la formación de callo seguido por los hipocótilos, raíces y por último las semillas, estas últimas aunque tardaron más, hubo un mayor porcentaje de explantes que formaron callo (78% A.c. y 83% A.h.), en comparación al

porcentaje obtenido en hipocótilos y raíces, en éstos la mayoría de los explantes murieron y los que sobrevivieron desarrollaron un callo poco friable y en menor cantidad que los demás. Para la presente investigación se eligió como el explante más apropiado para inducción de callo en ambas especies de Amaranth las hojas cotiledonarias de 7 días de edad y posteriormente después de hacer algunos ensayos se decidió también usar explantes del mismo tamaño (4mm) para así reducir la fuente de error del experimento, ya que se observó que explantes con la misma edad pero diferente tamaño responden de forma de forma diferente, así se determinó que el tamaño del explante inicial, además del tipo y la edad representan un factor crítico en la inducción de callo.

CUADRO 10. Respuesta de diferentes tipos de explantes de plántulas de 7 días de edad a la inducción de callo en *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

Tipo de explante	<i>A. cruentus</i>				<i>A. hypochondriacus</i>			
	Características de los Callos *							
	1	2	3	4	1	2	3	4
Hojas cotiledonarias	5.5±1.0	92%	4x	4x	4.2±0.8	99%	4x	4x
Hipocótilos	7.8±0.8	49%	2x	3x	8.2±0.9	53%	3x	4x
Raíces	8.0±0.8	45%	2x	4x	8.8±1.3	42%	2x	2x
Semillas	13.1±0.9	78%	3x	4x	12.3±1.5	83%	3x	4x

- * 1 Día en que se inicia la formación de callo (media± error estándar).
- 2 Porcentaje de explantes en los que se forma callo.
- 3 Friabilidad del callo a las 4 semanas (valores 1x, 2x, 3x y 4x descripción en metodología).
- 4 Crecimiento del callo a las 4 semanas (valores 1x, 2x, 3x y 4x descripción en metodología).

4.1.2 CULTIVO DE CALLOS.

4.1.2.1 Inducción de Callos.

Se ha sugerido que el éxito del cultivo *in vitro* depende del explante y del medio de cultivo, así una vez que se decidió usar las hojas cotiledonarias como explante inicial para la inducción de callo fue necesario seleccionar el medio más apropiado. Durante los últimos 40 años se han establecido las principales condiciones nutricionales y ambientales para el crecimiento ilimitado de células, tejidos y órganos de diferentes plantas. Sin embargo, los requerimientos nutricionales para el crecimiento óptimo dependen de la especie vegetal y del tipo de material que se desea cultivar, hasta la fecha no existe un medio de cultivo satisfactorio de uso general. Para encontrar el medio más apropiado para la inducción de callo a partir de las hojas cotiledonarias se eligieron 3 medios de cultivo básicos de uso general: MS (Murashige y Skoog, 1962), B₅ (Gamborg *et al.*, 1968) y SH (Schenk y Hildebrandt, 1972), (Cuadro A.1) aunque este último no se ha reportado en el cultivo *in vitro* del Amarantho, es un medio ampliamente usado para cultivos *in vitro*. Además se usaron 4 combinaciones hormonales, de auxinas y citocininas (Cuadro 4). Las auxinas promueven la elongación celular y las citocininas la división celular, y la combinación de ambas o una sola pueden inducir diferentes respuestas en el material cultivado. La formación de callo fue relativamente fácil, ya que en todos los medios probados se presentó. Este se inició por una elongación e hinchazón de explante, posteriormente comenzaron a aparecer puntos blancos o amarillos hasta llenar casi toda la superficie del explante dándole una apariencia rugosa, después estos puntos comienzan a crecer desarrollándose el callo en los explantes (Cuadro 11 y 12). La mayoría de los puntos donde se inició el callo fueron de color verde para A.c. y de color rojo y verde para A.h. En algunos trabajos (Caplin, 1963, Tran Thanh Van, 1978) se ha reportado que la posición del explante influye en la respuesta, sin embargo, en este trabajo se observó que independientemente de la posición de las hojas cotiledonarias en el medio todas formaron callo. El primer subcultivo se hizo a las 4 semanas, manteniendo el explante original junto con el callo formado, ya que se ha

CUADRO 11. Efecto de diferentes medios básicos y combinaciones y concentraciones hormonales sobre la inducción de callos en *A. cruentus*.

Tratamiento*	Características del callo**			Formación de estructuras organizadas(%)		
	Crecimiento	Friabilidad	Color	Raíces Brotes Raíces-Brotes		
1	4x	4x	B-A	10	0	0
2	4x	3x	B-A	0	0	0
3	3x	4x	A-C-V	11.11	11.12	4.16
4	3x	2x	A-C	0	7.14	28.57
5	4x	4x	B-A	0	0	0
6	3x	3x	A-C	0	0	0
7	4x	3x	B-A	0	0	0
8	3x	2x	A-C-V	6.25	6.58	0
9	4x	4x	B-A-V	0	16.66	0
10	3x	2x	B-A-C	0	31.125	0
11	3x	2x	A-C	0	0	0
12	3x	3x	A-C-V	10.51	31.125	0

* Descripción de tratamiento Cuadro 4.

** Para valores de crecimiento y friabilidad ver metodología; color; A-amarillo; B-blanco; C-café; V-verde.

reportado que es necesario subcultivar ambos para asegurar que continúe el crecimiento (Dodds y Roberts, 1982), en los subcultivos subsecuentes se transfirieron aproximadamente 2 g de callo de la superficie para mantener el cultivo y evitar la deficiencia de algún nutriente, además de ser necesaria esta transferencia para evitar la acumulación de metabolitos secretados por el callo en crecimiento y que lleguen a niveles tóxicos.

La formación de callo en ambas especies se observó en los 12 tratamientos (Cuadro 11 y 12, Fig. 4), al hacer el análisis de varianza, AN(AVA, (Cuadro A.3) con la variable de porcentaje de formación de callo por tratamiento mostró diferencias significativas para el medio de cultivo, entonces se aplicó la prueba de comparación de medias (Tukey $\alpha = 0.05$) para el medio de cultivo, éstas indican que los mejores medios inductores de callo

CUADRO 12. Efecto de diferentes medios básicos y combinaciones y concentraciones hormonales sobre la inducción de callos en A. hypochondriacus.

Tratamiento	Características del callo**			Formación de estructuras organizadas(%)		
	Crecimiento	Friabilidad	Color	Raíces	Brotos	Raíces-Brotos
1	4x	4x	A	0	0	0
2	4x	3x	A	0	0	0
3	4x	4x	A-R	10.51	0	0
4	3x	2x	A-R-V-C	3.57	53.56	10.72
5	4x	4x	A-R	0	0	0
6	4x	3x	A	0	0	0
7	4x	4x	A	0	0	0
8	3	3x	A-R-V	11.9	50.66	13.09
9	4x	4x	B-A-R	9.12	0	0
10	4x	3x	A-C-V	8.34	8.34	0
11	4x	3x	A-V	0	45.6	0
12	3x	3x	B-A	10.51	0	0

* Descripción de Tratamiento Cuadro 4.

** Para valores de crecimiento y friabilidad ver metodología; Color: A-amarillo; B-blanco; C-café; R-rojo; V-verde.

para A. cruentus fueron los medios 1 ($MS+2,4 \cdot D+BA$), 5 ($B_3+2,4 \cdot D+BA$), 9 ($SH+2,4 \cdot D+BA$) y 11 ($SH+2,4D+K+GA_3$) con un promedio de formación por tratamiento de 98, 100, 100 y 97% respectivamente y para A. hypochondriacus los cuatro medios antes señalados, más el medio 6 ($B_3+2,4 \cdot D+K$), donde los 3 primeros tuvieron un promedio de porcentaje de 100% y el 11 y 6 con 98 y 97% respectivamente. Al hacer el análisis de varianza a los datos del día en que se inició la formación de callo, se puede observar que en los diferentes tratamientos se observaron diferencias significativas en lo que respecta a la media y se aplicó también la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). La comparación de medias indica que existieron para A. cruentus 4 tratamientos estadísticamente iguales con el menor tiempo de inducción, de esta manera los medios en los que el callo se inició más rápido para esta especie fueron el 1 ($MS+2,4 \cdot D+BA$) con 5.2 ± 1.0 días, el

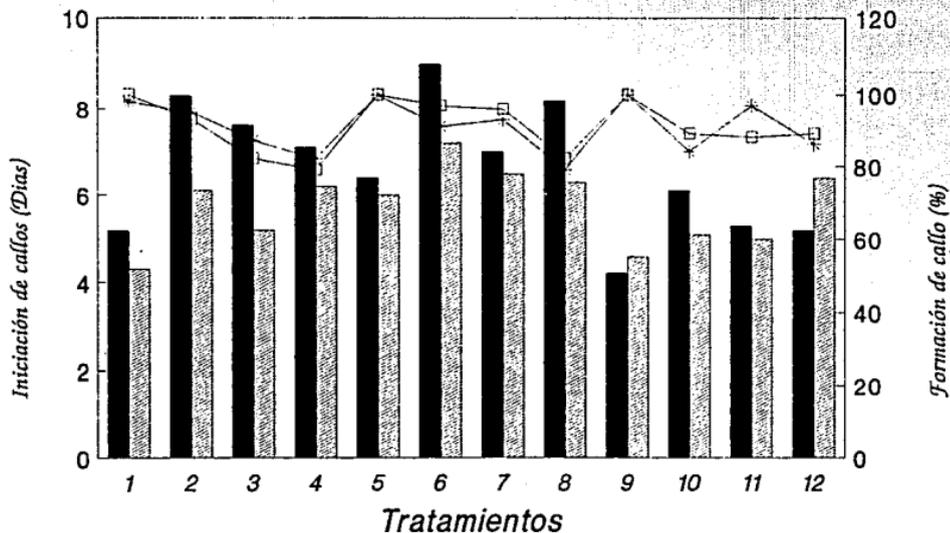


Fig. 4. Iniciación (■ *A. cruentus*; ▨ *A. hypochondriacus*) y porcentaje de formación de callo (* *A. cruentus*; □ *A. hypochondriacus*) por tratamiento. En la figura se muestra la media de los valores obtenidos.

9(*SH*+2,4-*D*+*BA*) con 4.2 ± 0.7 días, el 11(*SH*+2,4-*D*+*K*+*GA*) con 5.3 ± 1.2 días y el 12(*SH*+2,4-*D*+*K*+*AN*(*A*)) con 5.2 ± 1.0 días, y dos medios, el 1 y el 9, para *A. hypochondriacus* con 4.3 ± 0.6 días y 4.6 ± 1.2 días respectivamente. En *A. cruentus* el tratamiento donde la formación de callo tardó más fue en el medio 6(*B*₃+2,4-*D*+*K*) con 9 ± 0.8 días, y para *A. hypochondriacus* fue el medio 6 también, con un tiempo de 7.2 ± 0.8 días (Fig. 4; Cuadro A.3). En términos generales las dos especies respondieron en forma similar, las diferencias fueron principalmente en el color del callo y la friabilidad. En *A. cruentus* siempre se presentó un color más claro, blanco-amarillo, y en *A. hypochondriacus* fue aparentemente más friable que *A. cruentus*. Un dato importante que se observó es que las respuestas eran muy similares en los tratamientos con la misma combinación hormonal aunque estuvieran en diferente medio básico, por ejemplo, los medios en los que se presentó una inducción más rápida de callo fueron los medios en los que se presentó una inducción más rápida de callo fueron los medios 1, 5 y 9, cada uno formado por el medio básico *MS*, *B*₃ y *SH* respectivamente más la adición de 1 mg l^{-1} de 2,4-*D* y 0.5 mg l^{-1} de *BA*. También los medios donde se observó un mayor desarrollo de estructuras organizadas (raíces y brotes) para ambas especies fueron los medios 4(*MS*+2,4-*D*+*K*+*AN*(*A*)) y 8(*B*₃+2,4-*D*+*K*+*AN*(*A*)) compuestos por el medio básico *MS* y *B*₃ respectivamente, más la adición de 2,4-*D* (1 mg l^{-1}), *K* (0.5 mg l^{-1}) y *AN*(*A*) (0.5 mg l^{-1}) y el medio 12 compuesto por el medio básico *SH* y la misma combinación hormonal en *A. cruentus* se formaron raíces y brotes y en *A. hypochondriacus* sólo raíces.

Los medios que presentaron un efecto similar en los explantes debido a la misma combinación hormonal corroboraron que es factible controlar más o menos la morfogénesis, pero no su regulación. (Tran Thanh Van, 1981) y que este control se puede dar dependiendo de las combinaciones hormonales del medio, siendo cada explante capaz de ser multiprogramable, es decir, capaces de iniciar patrones morfogenéticos distintos (Tran Thanh Van, 1981), por ejemplo, la combinación hormonal en donde la formación de callos fue mejor, es donde hubo una mayor concentración de auxina. Se ha mencionado que las auxinas en elevadas concentraciones son propicias para la formación de callos, ya que en estas condiciones pueden suprimir la morfogénesis

(Gamborg, *et al.*, 1976). En este caso se observó que el mejor medio para la inducción de callos fue donde se usó 2,4-D en una concentración de 1 mg/l, esta auxina sintética es más potente que las auxinas naturales, pero también fue necesario la adición al medio de citocinina (BA 0.5 mg/l). Existe un efecto sinérgico entre las auxinas y citocininas, para la división y diferenciación celular, de esta manera la auxina sin citocinina provoca alargamiento celular del tejido cultivado y con citocinina se provoca la división celular. Cuando la proporción de auxina/citocinina es relativamente alta generalmente existe diferenciación de las células hacia primordios radicales, como se pudo observar los medios que se usaron tienen una mayor concentración de auxinas que de citocininas y/o giberelinas, es probable que debido a esto hubo un mayor índice de formación de callos y de raíces que de brotes a partir de los explantes originales (hojas cotiledonarias), en el caso de los medios 4 y 8 principalmente la combinación hormonal de K y AA con 2,4-D fue benéfica para la inducción de estructuras organizadas (raíces y brotes).

Como el objetivo de esta parte de la investigación era la selección del medio más apropiado para la inducción de callos, se consideran los medios 1, 5 y 9, compuestos por el medio básico MS, B, y SH respectivamente más la adición de 2,4-D (1 mg/l) y BA (0.5 mg/l) como los mejores para ambas especies. Los medios en los cuales hubo formación de brotes directamente a partir del explante inicial (medios 4, 8, 10 y 11), se considerarán para estudios posteriores con el fin de optimizarlos, ya que actualmente hay pocos reportes (Flores *et al.*, 1982; Bagga *et al.*, 1987) donde se han obtenido brotes directos, y esto es importante debido a que el amaranto es un cultivo que se planea reintroducir a gran escala como alimento para el hombre, forraje, colorantes, etc., y la micropropagación sobretodo clonal sería muy favorable para las líneas de interés.

4.1.2.2 Proliferación y Mantenimiento de Callos.

En ocasiones el medio inductor de callo no es el óptimo para la proliferación y/o mantenimiento de los mismos, por esta razón se dio

seguimiento al crecimiento celular del callo en diferentes medios de cultivo con el fin de evaluar cualitativamente el mejor medio. En primer lugar se evaluaron los 3 medios en los que se observaron los mejores resultados en la inducción de callo (medios 1, 5 y 9, Cuadro 4). Al establecer las cinéticas de crecimiento se trató de reducir al mínimo las fuentes de error, así por ejemplo el callo que se usó para las cinéticas provenía de un solo explante por tratamiento, ya que se ha mencionado que aun cuando el callo se obtenga de una misma planta, inóculo e inclusive frasco presentan algunas veces respuestas diferentes debido a la alta variabilidad que se presenta en el mismo, (Singer y McDaniel, 1986). También se ha reportado que al dividir el callo no se tiene la certeza de que las fracciones sean iguales y posean el mismo potencial de crecimiento (Singer y McDaniel, 1986), el daño mecánico al tejido y la heterogeneidad fenotípica (morfológica, bioquímica, etc.) pueden afectar la respuesta del callo, por lo que también se tuvo cuidado en tomar solamente el callo que se encontrara en la superficie de la masa callosa, que es la porción de crecimiento activo (Dodds y Roberts, 1982; Singer y McDaniel, 1986). De esta manera se proliferó el callo proveniente de un explante en su respectivo medio inductor para cada especie y posteriormente se sembraron de 0.5 ± 0.01 g. de callo en cada frasco de 45 ml. con 10 ml. de medio, cada 3 días se tomaron las muestras como se indica en la metodología. El tamaño del inóculo inicial se definió después de algunos ensayos preliminares, tomando en cuenta que el fragmento usado fuera el mínimo necesario para asegurar la reanudación del crecimiento, (Singer y McDaniel, 1986) y en el cual se pudieran observar todas las fases del ciclo de crecimiento. En ambas especies se observó una cinética de crecimiento tipo sigmoidal, en donde el medio 9 (SH+2,4-D+BA) tuvo un mayor crecimiento de callo seguido por el medio 1 (MS+2,4-D+BA) y por último el medio 5 (B₅+2,4-D+BA), (Fig. 5 y 6, Cuadros A.4 y A.5). Los tres medios que presentaron un mejor crecimiento de callo tienen la misma combinación y concentración hormonal, 2,4-D (1.0 mg l⁻¹) y BA (0.5 mg l⁻¹), de esta manera se observa que la combinación hormonal es importante para la respuesta celular; sin embargo, posteriormente al comparar más detalladamente el crecimiento del callo en los tres medios donde la diferencia es únicamente la concentración de sales

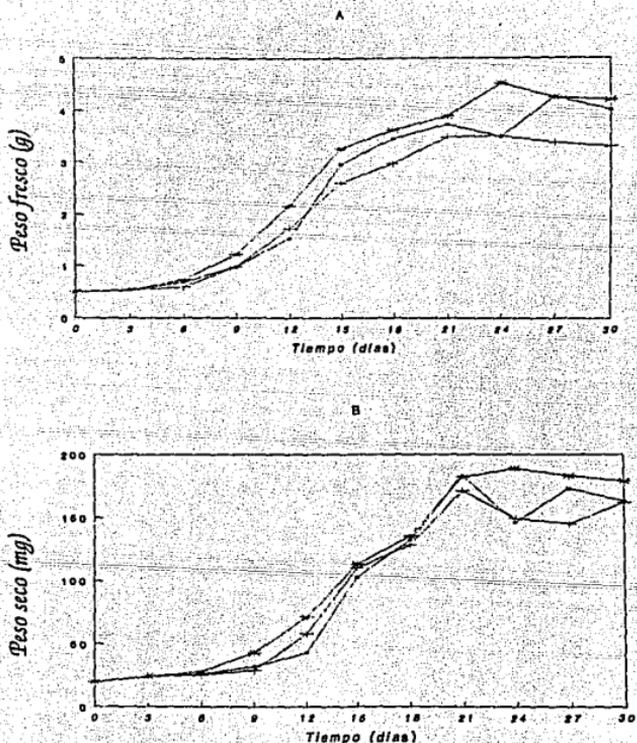


Fig. 5. Cinética del crecimiento del cultivo de callos de *A. cruentus* en los tres mejores medios de cultivo (— MS(1); + B₂(5); * SH(9)). En la figura se muestra la media de los valores obtenidos de (A) Peso fresco (g) y (B) Peso seco (mg).

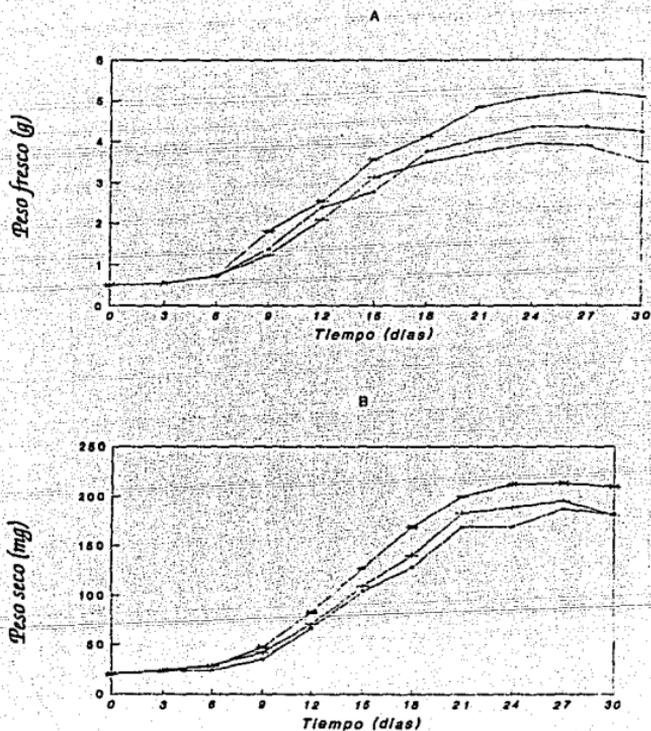


Fig. 6. Cinética del crecimiento del cultivo de callos de *A. hypochondriacus* en los tres mejores medios de cultivo (■ MS(1); + B₅(5); * SH(9)). En la figura se muestra la media de los valores obtenidos de (A) Peso fresco (g) y (B) Peso seco (mg).

(MS(1), B₃(5) y SH(9)) se ve que tienen un efecto sobre el crecimiento celular, aunque menos evidente. Se han hecho algunos estudios sobre el efecto de la concentración y combinación de macronutrientes, micronutrientes y otros factores del crecimiento en las células vegetales, (Murashige y Skoog, 1962; Linsmaier y Skoog, 1965; Gamborg, *et al.*, 1976) y dependiendo de la especie, tipo de explante y respuesta deseada, pueden o no afectar estos cambios. En este caso las diferentes combinaciones y concentraciones de nutrientes de los medios básicos sí afectaron el crecimiento del callo, las diferencias más significativas del medio SH, en este caso el mejor para el crecimiento del callo de *Amaranthus* sp., con respecto a los medios básicos MS y B₃, son que en el medio SH se tiene una concentración de sales minerales ligeramente más alta que en el medio B₃, y el amonio y el fosfato son agregados en un solo compuesto, también el medio B₃ contiene relativamente más bajas cantidades de amonio, por otra parte el medio MS contiene un alto contenido de nitrato, potasio y amonio respecto a los otros dos medios nutritivos. En resumen es factible indicar que para el mejor crecimiento de callo de las dos especies estudiadas aquí, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*, se requiere de una ligera mayor concentración de sales minerales respecto al medio B₃, así como una elevada concentración de amonio y fosfato, sin embargo, no tan grande la concentración de amonio como en el medio MS, así como de nitrato y potasio, otra diferencia del medio SH con respecto a los otros dos fue la elevada concentración de inositol, ácido nicotínico y tiamina. Debido a que se obtuvieron los mejores valores tanto cuantitativos (crecimiento), como cualitativos (color, friabilidad) para la proliferación de callos en el medio SH con 2,4-D y BA (9). Para ambas especies, se decidió hacer algunas modificaciones en la concentración hormonal de este medio (Cuadro 5) con el fin de optimizar el medio de proliferación. Las cinéticas de crecimiento se siguieron durante 3 meses para poder observar la respuesta del callo al nuevo medio, ya que durante el primer mes del subcultivo no se produjo la misma respuesta, esto debido probablemente a la aclimatación que se presenta en las células cultivadas *in vitro*. Durante el tercer subcultivo la tendencia sigmoidal en la cinética de crecimiento fue observada en ambas especies (Fig. 7 y 8, Cuadro A.6 y A.7). Este tipo de crecimiento ha sido reportado en

diferentes cultivos *in vitro* (Steward, 1968; King y Street, 1977; Street, 1977). Los medios en los que se presentó un mayor crecimiento de callo fueron los tratamientos 9(2,4-D 1.0 mg/l + BA 0.5 mg/l), 9a(2,4-D 1.0 mg/l) y 9c(2,4-D 0.5 mg/l) (Cuadro 5), los dos primeros contienen la concentración más alta de auxina; por otro lado, los medios en los que se presentó un menor crecimiento fueron el 9d que no contiene reguladores de crecimiento y el 9b que contiene igual concentración de BA y 2,4-D (0.5 mg/l). Debido a que el callo cultivado en el medio 9 (2,4-D 1.0 mg/l + BA 0.5 mg/l) presentó un mayor crecimiento y mejor apariencia, en cuanto a friabilidad y color, se eligió como el más adecuado para la proliferación de ambas especies. Con base a estos resultados se puede observar que es muy importante la combinación de auxinas y citocininas (aux/cit) para obtener un buen crecimiento del callo de Amarantho, ya que cuando el medio está suplementado solamente con auxina (2,4-D) el callo crece más lento y menos friable, siendo de esta manera evidente el uso de la citocinina para lograr la disgregación del callo. Por otra parte en ausencia total de hormonas se observó un crecimiento menor del callo y mucho más compacto que en los medios con solamente auxinas. De esta manera el 2,4-D actúa en el callo promoviendo su crecimiento y la BA aumenta la friabilidad del mismo.

Ya seleccionado el medio para la proliferación de los callos se procedió a evaluar las diferentes fases de las curvas de crecimiento en este medio (9) para ambas especies (Fig. 7 y 8, Cuadro A.4 y A.5). Así la fase lag o de retardo se observó en ambas especies hasta los tres días; esta fase se caracteriza porque no se observa ninguna señal de crecimiento, es el tiempo durante el cual el inóculo se adapta a las nuevas condiciones ambientales, ya que la transferencia de medio puede ser un cambio bastante drástico para las células. La fase exponencial se presentó en los tres medios (1, 5 y 9) de los 6-9 días, esta fase se caracteriza por un incremento de la velocidad de división celular en forma exponencial, se puede observar que la pendiente es mayor en *A. hypochondriacus* que en *A. cruentus*; enseguida sigue la fase lineal que va en *A. cruentus* del día 9 al 15 y en *A. hypochondriacus* del 9 al

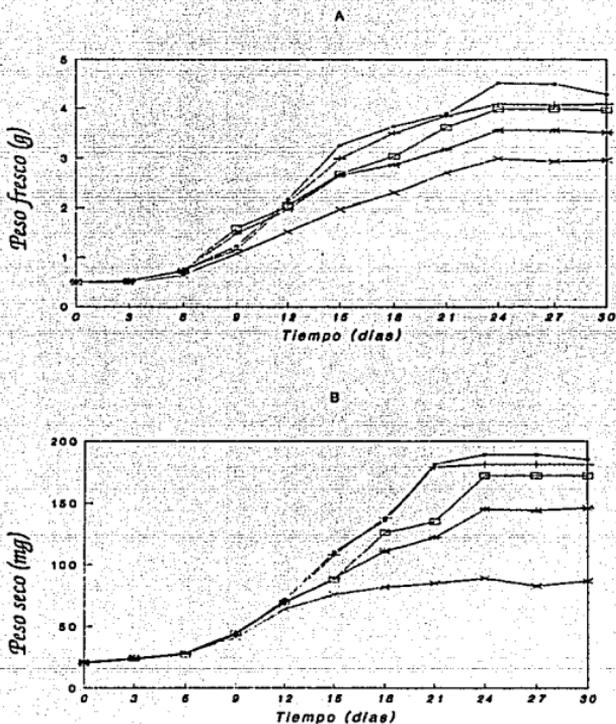


Fig. 7. Cinética del crecimiento de callos de *A. cruentus* en el medio básico SH con diferentes combinaciones y concentraciones hormonales. (■ 2,4-D/BA; ▲ 2,4-D; ★ 2,4-D/BA; ◻ 2,4-D; ✕ sin hormonas). En la figura se muestra la media de los valores obtenidos de (A) Peso fresco (g) y (B) Peso seco (mg).

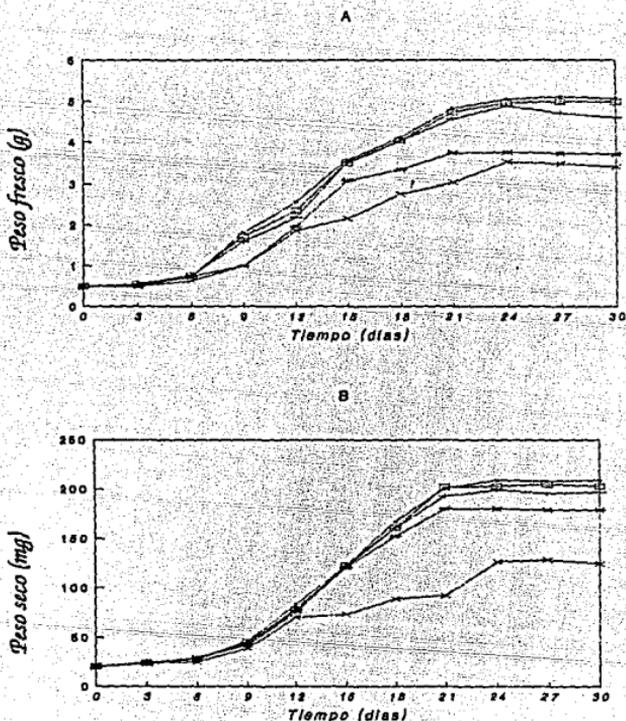


Fig. 8. Cinética del crecimiento de callos de *A. hypochondriacus* en el medio básico SH con diferentes combinaciones y concentraciones hormonales. (● 2,4-D/BA; ▲ 2,4-D; * 2,4-D/BA; □ 2,4-D; × sin hormonas). En la figura se muestra la media de los valores obtenidos de (A) Peso fresco (g) y (B) Peso seco (mg).

21, en esta fase se sigue incrementando la división celular del cultivo hasta llegar a la fase de disminución progresiva, que como su nombre lo indica comienza a haber una disminución del crecimiento, hasta llegar a la fase estacionaria en ambos cultivos a los 24 días, en esta fase el cultivo para su crecimiento debido a varias causas como deficiencia de algún nutriente, la falta de espacio, o bien debido al incremento de algún metabolito secretado por el mismo callo que le sea tóxico, etc. Respecto al subcultivo de los callos se observó una diferencia entre ambas especies ya que el callo de A. hypochondriacus fue necesario subcultivarlo uno o dos días después de haber entrado a la fase estacionaria, de otra forma el callo comenzaba rápidamente a ponerse de color café (fenolizarse) hasta necrozarse, debido a la presencia de betacianinas en esta especie, en cambio los callos de A. cruentus podían permanecer en el medio de cultivo hasta una semana después de haber llegado a la fase estacionaria. No obstante después de 1 o 2 subcultivos a tiempo los callos de ambas especies volvían a recuperar su apariencia normal.

4.1.3 CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION

4.1.3.1 Establecimiento del Cultivo.

Para el establecimiento del cultivo de células en suspensión, se transfirió callo friable (aproximadamente 3 g) del cultivo de callos en fase estacionaria a matraces erlenmeyer de 125 ml de medio, los medios que se usaron para el cultivo fueron los mismos que se usaron para la inducción de callos y su proliferación, (Cuadro 4, tratamientos 1, 5 y 9). Los 2 primeros subcultivos fueron cada semana, en éstos, únicamente se agregaron 15 ml de medio fresco a cada matraz, a la tercera semana se tamizó el cultivo con una malla de alambre para eliminar las células que no se disgregaron y de esta manera tener un cultivo más 'homógeno'. Posteriormente se transfirieron alícuotas de 10 ml a matraces de 250 ml con 60 ml de medio y a matraces de 500 ml con 120 ml de medio, hasta aclimatarlas, y así tener los cultivos de células stocks para cada especie y tratamientos. Para determinar la cinética de crecimiento de ambas especies se sembraron 50 matraces por cada

tratamiento como se indicó en la metodología. Al igual que en callos se usaron células provenientes de un sólo cultivo stock por tratamiento para reducir al mínimo las fuentes de error. Para cada matraz que se agregaron 0.30 g de células por cada 30 ml de medio, esta concentración se definió como la media de los valores usados en diferentes cultivos. El comportamiento que presentaron las células durante su ciclo de crecimiento mostró curvas del tipo sigmoidal (Fig. 9 y 10), en donde los valores de PF y PS fueron diferentes dependiendo del medio. La diferencia del medio 9 ($SPH + 2,4 \cdot D + BA$) con respecto a los otros dos, 5 ($B_2 + 2,4 \cdot D + BA$) y 1 ($MS + 2,4 \cdot D + BA$), en cuanto a diferencia de crecimiento fue más marcada en el cultivo de células en suspensión que en el de callos, sobre todo en el caso de A. hypochondriacus. Por otra parte la apariencia de las células fue un poco diferente en ambas especies, por ejemplo: el cultivo de A. cruentus creció más lento pero su apariencia fue mejor, es decir, de color blanco-amarillo, con pocos conglomerados grandes, la mayoría de sus células estaban solas o en grupos de 3 y 6, la forma esférica de las células se mantuvo durante todo el ciclo de crecimiento. El cultivo de A. hypochondriacus tuvo un mayor crecimiento, el color de este fue amarillo o amarillo-café, la mayoría de sus células estuvieron solitarias o en pares, aunque también se presentaron algunos conglomerados de numerosas células, la forma de las células fue principalmente esférica y al final del ciclo de crecimiento de forma alargada. Las fases de las cinéticas de crecimiento de las células en ambas especies fueron las siguientes: La fase de reposo se presentó hasta los 3 días, pero a diferencia de lo que pasa en callos, aquí no sólo no hay división celular, sino que además hubo una disminución de PF y PS, esto puede ser atribuido a que el cambio de células a un medio fresco es 'un evento drástico' y algunas de las células mueren antes de adecuarse al nuevo medio o bien, debido al método empleado en la determinación de estos valores (PF y PS), ya que los errores estándar fueron muy elevados (Cuadro A.8 y A.9); La fase exponencial va del día 3 al 9 en A. cruentus y del día 3 al 5 en A. hypochondriacus, en esta fase las células presentan la mayor tasa de crecimiento de toda la cinética; enseguida continúa la fase lineal que llega hasta el día 18 de ambas especies, en este período se mantiene constante la tasa de crecimiento; y por último la

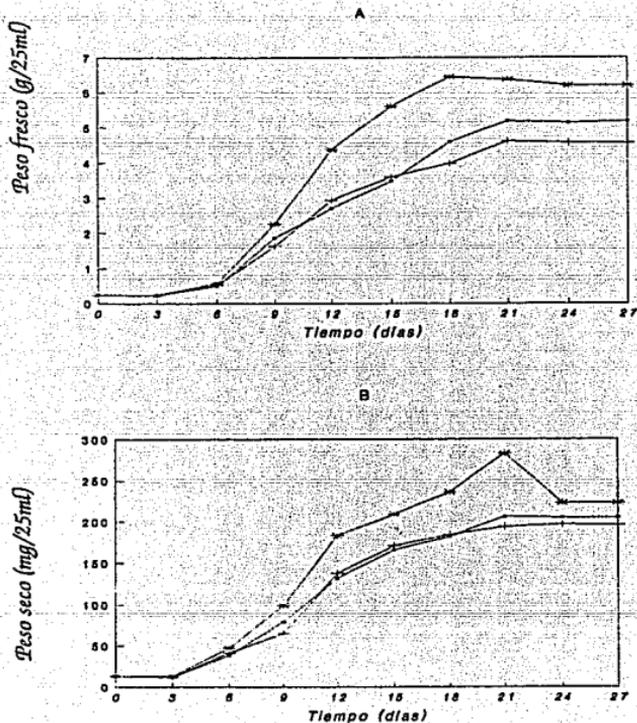


Fig. 9. Cinética del crecimiento de células en suspensión de *A. cruentus* en los tres mejores medios de cultivo (-■- MS(1); -+ B₂(5); -* SH(9)). En la figura se muestra la media de los valores obtenidos de (A) Peso fresco (g) y (B) Peso seco (mg).

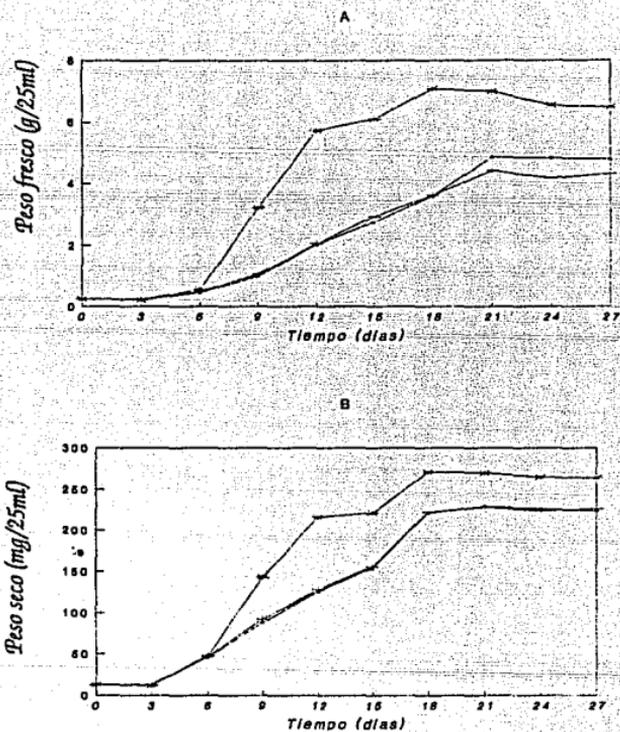


Fig. 10 Cinética del crecimiento de células en suspensión de *A. hypochondriacus* en los tres mejores medios de cultivo (—•— MS(1); -+ B₃; —*— SH(9)). En la figura se muestra la media de los valores obtenidos de (A) Peso fresco (g) y (B) Peso seco (mg).

disminución progresiva que llega hasta el día 21, a partir del cual comienza la fase estacionaria para ambas especies. Hubo una mayor acumulación de biomasa en *A. hypochondriacus* que en *A. eruentus* (Fig. 9 y 10, Cuadro A.8 y A.9). En las células en suspensión, además del peso fresco y seco se determinaron otros parámetros de crecimiento celular que fueron: el volumen del paquete celular (VPC) y número de células (# de cél.) (Cuadro A.10). Con respecto al volumen del paquete celular ambas especies fueron crecidas en el medio de proliferación, el 9 (SH+2,4·D+BA), y el comportamiento fue sigmoidal (Fig. 11). A pesar de que el error estándar de los valores medios fue en ocasiones casi del 25% de la media de los datos (Cuadro A.11), esto se debió probablemente a la metodología usada, ya que al medir el volumen de las células y del medio, y al pesar las células, éstas se quedaban pegadas en los diferentes recipientes usados (probeta, matraz, etc.), por otra parte y quizá la fuente de variación más importante es que al filtrar (al vacío) el medio de cultivo de las células, el contenido de humedad que quedó entre unas y otras muestras fue muy variable. Al graficar el número de células contra el tiempo nuevamente se observó un comportamiento sigmoidal (Fig. 11). Para contar las células se separaron los conglomerados, esto se logró agregando 100 µl de HCl 1N por cada 200 µl de células. Un dato más que se cuantificó en estos cultivos fue la viabilidad de las células (Fig. 11), ya que se observó que al no subcultivar las células inmediatamente después de haber llegado a la fase estacionaria, comenzaban a cambiar de un color amarillo en *A. hypochondriacus* y blanco-amarillo en *A. eruentus* a un amarillo oscuro y posteriormente café, con el fin de ver si esto era debido a la muerte de las células al llegar a la fase estacionaria de la cinética de crecimiento, así como también para ver si la disminución de P_f y P_S en los primeros 3 días de la cinética era causado por la muerte de las células, sin embargo, se observó un comportamiento estable de los valores de viabilidad, este valor nunca fue mayor del 84% y a lo largo de todo el ciclo el valor de viabilidad se mantuvo oscilando alrededor del 80% hasta llegar a la fase estacionaria donde comienza a disminuir rápidamente (Fig. 11). El tiempo entre un subcultivo y otro, fue de 21 días, ya que de otra forma las células del cultivo comenzaban a morir y estos últimos cultivos eran más difíciles de recuperar que los cultivos de callos.

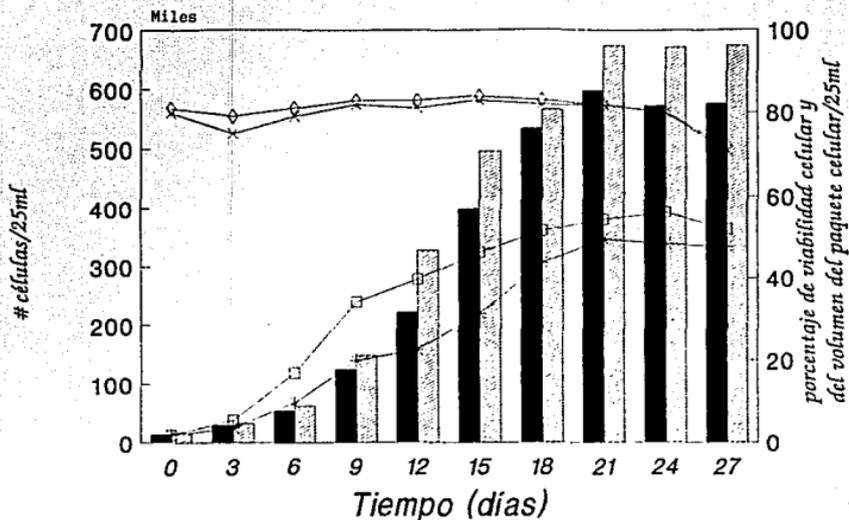


Fig. 11. Número de células/25 ml (■ *A. cruentus*; □ *A. hypochondriacus*), viabilidad celular (%) (* *A. cruentus*; ◇ *A. hypochondriacus*) y volumen del paquete celular/25 ml (%) (* *A. cruentus*; □ *A. hypochondriacus*), durante la cinética del crecimiento de células en suspensión en el medio SH+2,4-D+BA. En la figura se muestra la media de los valores obtenidos.

Al comparar las cinéticas de crecimiento de los callos y las células en suspensión se observó que en estas últimas el ciclo de crecimiento se completó más rápido (21 días en células, 27 días en callos), por otra parte y de acuerdo a los resultados que se obtuvieron, las células en suspensión parecen ser el modelo más apropiado para la evaluación de las cinéticas de crecimiento de las células de amaranto cultivadas *in vitro*, debido a que se cuenta con una mayor cantidad de parámetros para cuantificarlo (peso fresco, peso seco, número de células y volumen del paquete celular), en cambio en callos sólo se pudo evaluar en base al peso fresco y peso seco. Además en el cultivo de células en suspensión se puede asegurar que todas las células tienen la misma oportunidad de estar en contacto con el medio, no así en el cultivo de callos, donde sólo una porción de las células tienen contacto con el medio nutritivo. El parámetro que se recomienda para la cuantificación de la cinética de crecimiento de células en suspensión es el peso seco, debido a que en este caso no hay variación de una muestra a otra de un mismo cultivo, sin embargo sería mejor emplear además otro parámetro para asegurar el comportamiento que siguen las células en su crecimiento celular. El parámetro que menos se recomienda para evaluar el crecimiento de las células de acuerdo a los resultados obtenidos es el volumen del paquete celular, ya que en este caso se presentó una mayor variabilidad de los datos obtenidos como se mencionó antes. La viabilidad, aunque no es un parámetro que se utilice para evaluar el crecimiento, es útil para observar el comportamiento de las células en el medio y poder corroborarlo con los datos de crecimiento para tener un panorama más completo de la cinética celular.

4.2 REDIFERENCIACION DE CALLOS.

4.2.1 ORGANOGÉNESIS INDIRECTA.

Uno de los objetivos principales del laboratorio de Biotecnología, del Centro de Genética del C.P. donde se realizó la presente investigación, es la selección de líneas celulares tolerantes a algún tipo de estrés, principalmente

salino e hídrico, por lo que es importante establecer la metodología para la regeneración de plantas a partir de callos y/o células en suspensión.

En esta parte del trabajo se establecieron las condiciones para regenerar plantas a partir de callos friables provenientes del medio de mantenimiento SH+2,4-D+BA (Cuadro 4, (9)). De esta manera para la inducción de organogénesis se probaron 12 tratamientos hormonales (Cuadro 6), usando como medio básico el SH, y eliminándose el 2,4-D en algunos medios y adicionándose una auxina menos fuerte, como el ANA, además de citocininas y giberelinas. La primera etapa consistió en la obtención de brotes a partir de callos de 2, 5, 7 y 14 meses de edad, se probaron diferentes edades debido a que en pruebas previas se observó que los callos respondían de diferente forma, dependiendo de su edad. Así se transfirieron 2 g de callo a los medios para inducción de brotes, se trató de escoger callo con la misma apariencia, es decir, friabilidad (4x), tasa de crecimiento alta (4x) y de color blanco-amarillo para A. cruentus y amarillo para A. hypochondriacus. El número de brotes por explante se determinó mediante la apreciación visual. La respuesta de las diferentes edades de callo de A. cruentus y A. hypochondriacus a las 8 semanas de haberse transferido a los diferentes tratamientos mostró que a mayor edad del callo la respuesta organogénica era menor, de hecho en los callos de 14 meses sólo se presentaron algunos cambios en la friabilidad, en cambio en los callos más jóvenes, se observaron cambios de friabilidad, color y en algunos casos la formación de estructuras organizadas (brotes y/o raíces) (Cuadro 13). Los medios que tuvieron mayor efecto sobre el callo en ambas especies fueron principalmente los que contenían sólo BA en concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 mg l⁻¹ (Cuadro 6 tratamientos 20, 21 y 22). La formación de brotes y/o raíces se dio en los tratamientos 20, 21, 22, 25, 28 y 31 (Cuadro 6) para ambas especies, y en A. hypochondriacus además en los medios 24, 29 y 30. Los callos de 2 meses de edad que formaron estructuras organizadas en ambas especies, cambiaron su friabilidad ya sea a 2x o 3x, el color en A. cruentus a amarillo-verde, en ocasiones café y en A. hypochondriacus cambió a color amarillo más oscuro, rojo y algunas veces verde y/o café (Cuadro 13). El mayor número de brotes formados para A. hypochondriacus fue en el tratamiento 20(0.5 mg l⁻¹BA), en

donde el porcentaje de frascos que presentaron brotes por tratamiento fue del 80% con un promedio de 20 brotes por frasco, otros medios que presentaron un alto porcentaje de formación de brotes fueron el 21 (1 mg^l-1 BA), 22 (1 mg^l-1 BA) y el medio 28 (0.5 mg^l-1 ANA+2.0 mg^l-1 K) con un promedio de 10 brotes por frasco (Fig. 12). Los medios en los que no hubo formación de estructuras organizadas fueron el 23, 26 y 27 (Cuadro 6), en éstos la concentración de auxinas (ANA) y citocininas (BA o K) fue de 0.5 mg^l-1, o bien, ligeramente mayor la concentración de K (1.0 mg^l-1). En el caso de A. cruentus la respuesta a la inducción de brotes fue mucho menor que en A. hypochondriacus, sin embargo, la respuesta a los tratamientos fue similar en los callos de ambas especies, por ejemplo, el medio 20 (0.5 mg^l-1 BA) también fue el tratamiento donde el número de brotes formados fue el más alto, 5 brotes por frasco (Fig. 12), en los demás tratamientos donde se presentó la formación de brotes fue mucho menor. Al hacer el análisis de varianza de los efectos de los medios sobre la inducción de brotes, las diferencias no fueron significativas para A. cruentus, pero para A. hypochondriacus sí hubo diferencia significativa, por lo que se aplicó la prueba de medias (Tukey = 0.05, Cuadro A.13). Los valores de inducción de brotes por tratamiento se pueden agrupar en tres niveles. Se decidió usar el medio 20 como el medio inductor de brotes a partir de callos de 2 meses de edad para ambas especies. Los brotes comenzaron a formarse en la periferia del callo después de que éste había cambiado la friabilidad y color, aproximadamente a las 4 semanas. En el tratamiento 20 y en los demás medios donde se formaron brotes se observó la presencia de algunos brotes con apariencia "anormal", es decir, hojas y tallos deformes. La capacidad de regeneración de los callos declina con los subcultivos subsecuentes, esta declinación del potencial organogénico es un fenómeno frecuente del cultivo de callos asociado con aberraciones cromosómicas agravadas por el 2,3-D y otras auxinas (Murashige, 1974). De esta manera en los callos de mayor edad (5, 7 y 14 meses) no se pudo obtener la inducción de brotes y una inducción esporádica de raíces. Por otra parte se ha mencionado el efecto de las citocininas sobre la morfogénesis, señalando que altas concentraciones de éstas inducen la iniciación de brotes, (Allan, 1981), de esta manera se observó que los brotes y raíces en ambas

especies se iniciaron en los medios con BA junto con otras hormonas (auxinas y giberelinas), pero siempre en mayor concentración la citocinina (20 (0.5 mgf⁻¹ BA), 21 (1.0 mgf⁻¹ BA), 22 (2.0 mgf⁻¹ BA), 25 (2.0 mgf⁻¹ BA + 0.5 mgf⁻¹ ANA) y 31 (2.0 mgf⁻¹ BA + 0.5 mgf⁻¹ ANA + 0.1 mgf⁻¹ GA), Cuadro 6). La cinetina (K) no tuvo un efecto favorable sobre la inducción morfogenética. Se ha reportado que la morfogénesis se inicia a partir de células meristemoides respondiendo a un estímulo se piensa que en este caso fue dado por la concentración de BA en el medio, en cambio la auxina ANA y la giberelina GA, inhiben el desarrollo de los brotes, se cree que la giberelina actúa previniendo la acumulación de almidón y en consecuencia evita la formación de brotes (Thorpe y Mier, 1982 In: Murashige, 1974), esta acumulación de azúcares y de almidón aumentan durante el periodo crítico de desarrollo de callos y que antecede a la iniciación de brotes.

Los brotes de apariencia "anormal", con malformaciones en las hojas y vitrificación se desecharon, quizá esto pudo ser debido a aberraciones cromosómicas que frecuentemente se presentan en las células cultivadas in vitro.

Los brotes normales se transfirieron a los medios para el alargamiento, estos medios variaron en la concentración de sales SH y concentración y combinación hormonal (Cuadro 7), donde se midió la longitud inicial que fue de 1.0±0.5 cm. y su elongación en cada subcultivo. En todos los tratamientos que se probaron hubo crecimiento de los brotes, sin embargo, se pudo observar algunas respuestas diferentes (Fig. 13, Cuadro A.14). En los medios con 25% de sales y cualquiera de las combinaciones hormonales presentaron los valores de crecimiento más bajos en ambas especies, por ejemplo en el tratamiento 38 (ANA+BA) los brotes presentaron un crecimiento promedio de 0.31 cm. para A. cruentus y 0.12 cm. para A. hypochondriacus y los valores de error estándar fueron en algunos casos de más del 50% del valor de la media (Cuadro A.13), en los tratamientos con esta concentración de sales SH. En cuanto a los tratamientos con las otras tres concentraciones de sales SH (50, 75 y 100%) los valores obtenidos fueron más o menos iguales, al hacer el análisis de varianza de los medios hubo diferencia significativa entre los medios, y al hacer la prueba de comparación

CUADRO 13. Efecto de diferentes combinaciones hormonales sobre la inducción de brotes en callos de *Amaranthus cruentus* y *Amaranthus hypochondriacus* de diferente edad.

Tratamientos	<i>Amaranthus cruentus</i>												<i>Amaranthus hypochondriacus</i>											
	2 meses			5 meses			7 meses			14 meses			2 meses			5 meses			7 meses			14 meses		
	F	C	E	F	C	E	F	C	E	F	C	E	F	C	E	F	C	E	F	C	E	F	C	E
20	2x	BAV	br	3x	BAV	0	3x	BA	r	4x	BA	0	2x	AVRC	br	3x	AR	0	3x	AR	0	4x	AR	r
21	2x	BAVC	br	3x	AC	r	3x	BA	0	4x	BA	0	2x	AVR	br	3x	AR	0	3x	AR	r	4x	A	0
22	3x	BAV	br	3x	BA	r	4x	BA	r	4x	BA	r	2x	ARC	br	3x	AR	r	3x	AR	r	4x	AR	0
23	3x	BA	0	4x	BA	0	4x	BA	0	4x	BA	0	3x	A	0	4x	AR	0	4x	A	0	4x	A	0
24	3x	BA	0	4x	A	0	4x	BA	0	4x	BA	0	3x	ARC	br	3x	A	r	4x	A	0	4x	A	0
25	2x	BAVC	br	4x	BAV	0	4x	BA	0	4x	BA	0	2x	ARV	br	3x	A	0	4x	A	0	4x	A	0
26	3x	BA	0	4x	BA	0	4x	BA	0	4x	BA	0	4x	A	0	4x	A	0	4x	A	0	4x	A	0
27	3x	BA	0	4x	BA	r	4x	BA	0	4x	BA	0	4x	A	0	3x	A	0	3x	AR	0	4x	A	0
28	3x	BAV	br	3x	BAV	0	3x	ARC	0	4x	BA	0	2x	ARV	br	3x	ARV	r	3x	AR	r	4x	A	0
29	2x	BA	0	4x	BA	0	4x	BA	0	4x	BA	0	3x	ARVC	b	3x	A	0	4x	A	0	4x	A	0
30	3x	BA	0	4x	BA	0	4x	BA	0	4x	BA	0	3x	AR	b	3x	A	0	3x	A	0	4x	A	0
31	2x	BAV	br	3x	AC	r	3x	BA	0	4x	BA	0	2x	ARVC	b	3x	A	r	3x	A	0	4x	A	r

F = Friabilidad (valores 1x, 2x, 3x y 4x)

C = Color (A-amarillo; B-blanco; C-café; R-rojo; V-verde)

E = Formación de estructuras (b-brotes; r-raíces).

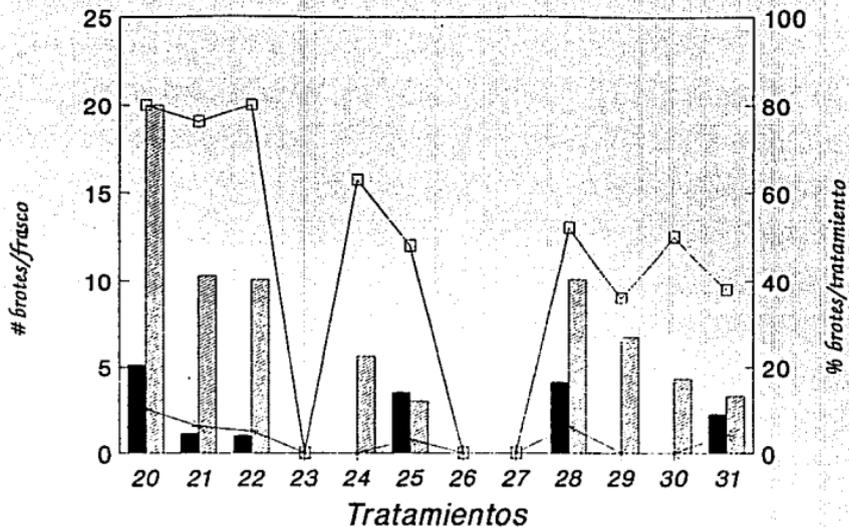


Fig. 12. Número de brotes por frasco (■ *A. cruentus*; ▨ *A. hypochondriacus*) y Porcentaje de brotes por tratamiento (*— *A. cruentus*; —□— *A. hypochondriacus*), en los diferentes medios usados en la inducción de brotes. En la figura se muestra la media de los valores obtenidos.

de medias (Tukey $\alpha = 0.05$) se pudo ver que las respuestas se pueden agrupar en dos grupos principales, uno con los medios que contienen 25% de sales SH junto con algunos otros de mayor concentración de sales pero que contienen ANA o GA, en el medio, y el grupo 2 con los demás tratamientos. En la figura 13 se puede observar el efecto de las diferentes combinaciones hormonales sobre el crecimiento de los brotes, se pueden agrupar en 7 bloques, por ejemplo los bloques que presentaron los valores de crecimiento más bajo están compuestos por ANA y GA, (bloque 2) ANA (bloque 4) y GA, (bloque 7) respectivamente, a pesar de que en la bibliografía se menciona que al GA, como útil en la estimulación de la elongación de brotes de Chenopodium quinoa entre otras especies (Burmouf-Radosevich y Paupardín, 1985). Después otros tres bloques con valores de elongación intermedios, éstos son el bloque 1 (ANA y BA), el bloque 3 (ANA, BA y GA) y el bloque 5 (BA y GA), por último el bloque 6 adicionado solamente con BA, con los valores de elongación más altos del experimento para ambas especies. En A. cruentus el medio 54 con BA y 50% de concentración de sales SH fue donde los brotes en promedio tuvieron un mayor crecimiento (1.73 cm) seguido por el medio 53 (BA+75% SH) con 1.22 cm y el medio 52 (BA+100% SH) con un crecimiento de 1.05 cm., en cambio en A. hypochondriacus no se observó tanta diferencia de crecimiento entre los medios adicionados con BA y un 50, 75 y 100% de concentración de sales SH. En esta ocasión la BA fue el mejor inductor de la elongación de los brotes. Finalmente se decidió usar los medios con 50% de sales y las combinaciones hormonales donde se presentó un mayor incremento en la elongación de los brotes (Cuadro 7, 34 (ANA+BA), 42 (ANA+BA+GA), 50 (BA+GA) y 54 (BA)). Conforme se avanzó en los subcultivos se vio que el medio 34 adicionado con BA y ANA presentó brotes más sanos, seguido por los medios con BA (54), con ANA, BA y GA, (42) y por último el medio con BA y GA,(50). Como se pudo observar los medios con concentración de sales del 25% fue insuficiente para los requerimientos nutricionales de los brotes, y los medios con 50 y 75% de sales SH fue donde respondieron mejor los brotes. En algunos brotes se observó el amarillamiento de la planta, abscisión de hojas y en algunos brotes la vitrificación. El amarillamiento de las hojas de los brotes se ha reportado que

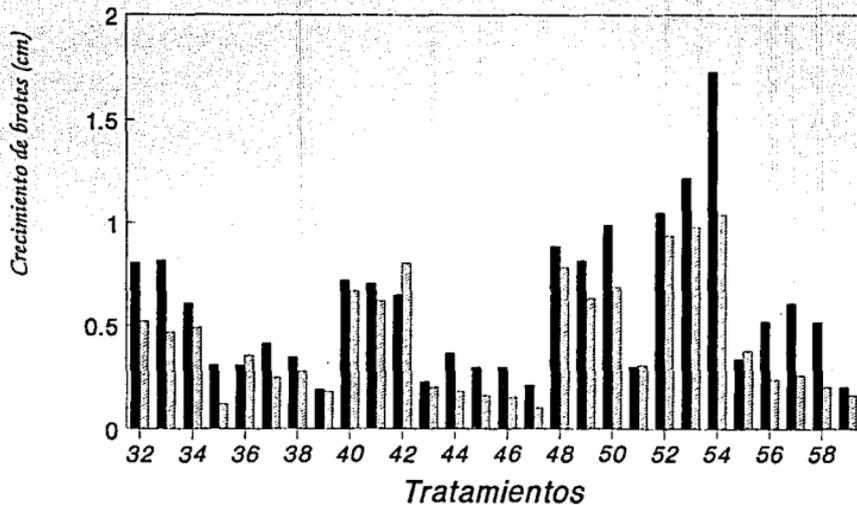


Fig. 13. Efecto de diferentes combinaciones hormonales sobre el crecimiento de brotes de *A. cruentus* (■) y *A. hypochondriacus* (□). En la figura se muestra la media de los valores obtenidos.

puede deberse a la reducción o deficiencia de la actividad fotosintética o debido a la falta de carbohidratos en el medio, por otra parte la caída de hojas se puede atribuir a la producción de etileno que es inducido por las auxinas (Burnouff-Radosevich y Paupardin, 1985). También estos autores reportan que para reducir la clorosis en los brotes es necesario aumentar el fosfato de sodio en el medio.

Después de permanecer los brotes en los medios de elongación por 2 meses se pasaron a 5 diferentes tratamientos para enraizamiento (Cuadro 8), estos medios consistieron en sales SH sin reguladores de crecimiento, o bien, solamente con auxinas (2,4-D y ANA). La formación de raíces se presentó en todos los tratamientos y el porcentaje de enraizamiento por tratamiento fue como mínimo del 75% y máximo del 95% en *A. cruentus* y del 80% mínimo y del 91% máximo para *A. hypochondriacus*, el número raíces, por apreciación visual, fue para ambas especies mayor en el medio que no contenía auxinas, y el que tuvo menor número de raíces fue el tratamiento con 1.0 mg/l de 2,4-D, sin embargo, en todos los medios las raíces crecieron muy bien y presentaron una apariencia vigorosa. Para el enraizamiento de brotes se decidió usar solamente el medio del tratamiento 60 sin hormonas de crecimiento. (Fig. 14, Cuadro A.15). Un aspecto importante que se observó en los brotes de *A. hypochondriacus* fue que al pasarlos al medio de enraizamiento (Tratamiento 60, Cuadro 8) se presentó en aproximadamente un 20% de los brotes la formación de flores, fue fácil distinguir el sexo de éstas, ya que las anteras de las flores masculinas eran bastante visibles. Las flores que se obtuvieron en forma de pequeños racimos fueron en su mayoría femeninas, éstas se mantuvieron verdes alrededor de 4 meses, después gradualmente se tornaron café o blancas y murieron. Actualmente no es conocido si la inducción de floración es debida a causas específicas que activan el meristemo y subsecuentemente determinan la floración de éstas, ya que también se ha sugerido que la edad, reguladores de crecimiento, luz, requerimientos de carbohidratos, estimuladores e inhibidores de la floración, etc. pueden inducir la floración. En algunos trabajos se ha establecido que las citocininas son un requerimiento común en la inducción de la floración, (Scorza, 1982). En cambio las auxinas la inhiben y las giberelinas

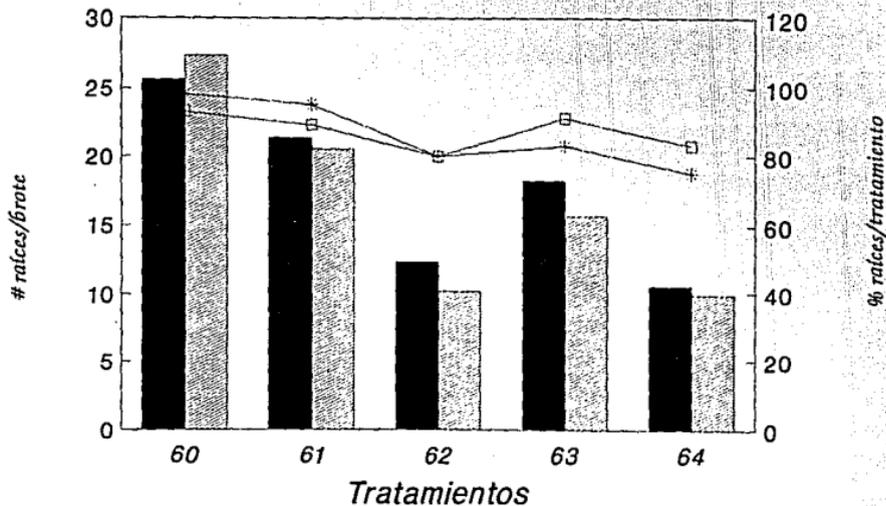


Fig. 14. Efecto de diferentes auxinas en el número de raíces formadas por brotes (■ *A. cruentus*; ▨ *A. hypochondriacus*) y el porcentaje de raíces por tratamiento (* *A. cruentus*; -□ *A. hypochondriacus*). En la figura se muestra la media de los valores obtenidos.

promueven la floración cambiando el brote de un estado juvenil a un estado de floración, (Scorza, 1982). Tisserat y Galletta (1988) mencionan en su trabajo sobre floración *in vitro* del amaranto que no son necesarios los reguladores de crecimiento para el desarrollo de inflorescencias sin embargo, encontraron que el fotoperiodo si tiene un efecto crítico en la floración. Otros autores también mencionan que los amarantos son muy sensibles a la longitud del día en la floración y ésta puede darse prematura, tardía, o bien, puede no presentarse dependiendo del fotoperiodo (National Research Council, 1984; Suárez, 1986).

4.2.2. EMBRIOGENESIS SOMÁTICA.

Las condiciones para la inducción de embriogénesis somática son generalmente determinadas empíricamente y es aún muy lejana una línea que se pueda extender como modelo a diferentes cultivos. El proceso embriogénico se puede realizar con base en tres pasos principales: Inducción, desarrollo y germinación de los embriones somáticos. Al igual que en el experimento de organogénesis se probaron cuatro edades de callo para la inducción de embriones somáticos en ambas especies. Los medios de cultivo que se usaron se fueron modificando cada 24 días (cada subcultivo) ya sea la combinación y/o la concentración hormonal. (Cuadro 9).

El experimento se inició a partir de callos con friabilidad 4x, tasa de crecimiento alta y color blanco-amarillo para A. cruentus y color amarillo para A. hypochondriacus. En ninguno de los tratamientos (A, B, C, D y E, Cuadro 9) se observó una respuesta de rediferenciación de las células a embrioides, en algunos callos se formaron raíces, pero esta formación fue esporádica y antes del siguiente subcultivo se volvían a desdiferenciar. En A. hypochondriacus la mayoría de los callos presentaron un color rojo que generalmente al siguiente subcultivo se tornaba café y comenzaban a tornarse nuevos puntos rojos en el callo, cuando el callo permaneció de color café disminuyó el crecimiento y su apariencia cambió a viscosa-húmeda pero la friabilidad generalmente no cambió. En el 3°, 4° y/o 5° subcultivos de algunos medios se observó la formación de conglomerados de células de forma

ovalada, éstos generalmente fueron de color verde o blanco-amarillo en ambas especies, sin embargo, estos conglomerados al subcultivarlos se tornaron de color café hasta confundirse con el resto del callo. Sin embargo, no se puede inferir si estos conglomerados eran grupos de células organizadas o células meristemáticas, ya que no se hicieron estudios anatómicos ni observaciones al microscopio, (Cuadro 14). Se supone que es probable que hayan sido grupos de células organizadas, ya que se ha reportado que al reducir sustancialmente o excluir completamente el 2,4-D se induce la embriogénesis asexual (Murashige, 1974), sin embargo, en otros reportes se menciona que la cantidad e intensidad de luz, la concentración del ion amonio (NH_4^+), la concentración de giberelina, el aumento de niveles de poliaminas, la concentración de sacarosa, etc. tienen efecto sobre la embriogénesis. Con respecto al amaranto, Flores *et al.*, (1982) obtuvieron embrioides en los medios MS y B₃ con 2,4-D ($3 \cdot 10^{-4}$ mg l⁻¹), sin embargo no pudieron continuar su crecimiento. Vasil y col. (1982), mencionan que generalmente el callo con crecimiento lento y compacto tiene mayor probabilidad de formar embrioides no así, los callos friables y de crecimiento rápido. También se ha visto que células provenientes de embriones inmaduros o inflorescencias jóvenes pueden ser usadas para inducir callo embriogénico.

4.3 DETERMINACION DE METABOLITOS.

La importancia de establecer las metodologías para la cuantificación de algunos metabolitos que tienen importancia a su respuesta al ser sometidos a estrés o de su tolerancia en este trabajo, radica en que es la base para poder realizar posteriormente estudios sobre la respuesta bioquímica de las líneas celulares a diferentes tipos de estrés. En este trabajo se obtuvieron resultados satisfactorios en todas las metodologías establecidas excepto el de glicina betaina y aminos cuaternarios.

4.3.1 AMINOÁCIDOS.

En la metodología para la cuantificación de aminoácidos totales se pudieron determinar las concentraciones de aminoácidos satisfactoriamente durante la cinética de crecimiento de callos y células en suspensión de ambas especies de amaranto (Fig. 15, Cuadro A.16). La mayor concentración de aminoácidos se presentó entre el 6° y 9° día de cultivo, que corresponde a la fase exponencial de crecimiento, después la concentración disminuye progresivamente. En numerosos reportes se ha mencionado que la concentración de los solutos en las células vegetales varía al ser sometidos a algún tipo de estrés. Por ejemplo, Iraki, *et al.* (1989), ha observado que células sometidas a estrés salino acumulan grandes cantidades de aminoácidos y azúcares como una forma de balancear osmóticamente el citoplasma con la vacuola que ésta a su vez acumula grandes cantidades de NaCl . Por otra parte también se ha observado que los cultivos que producen altos niveles de prolina, ésta funciona como indicador de la sensibilidad de la planta a la deshidratación asociada al estrés. La prolina juega un papel importante en el proceso de recuperación post-estrés del metabolismo. Esta acumulación puede ser usada como sustrato de nitrógeno, carbón o como fuente de energía (Aloni y Rosenshtein, 1982). Otros autores mencionan además que los aminoácidos, en especial la prolina, puede ser una adaptación al estrés hídrico acumulándose grandes cantidades de éstos, sin embargo, su papel en el ajuste osmótico o de desintoxicación de solutos no está claro aún. (Stewart y Lee, 1974 In: Aloni y Rosenshtein, 1982; Hlanda *et al.*, 1983; Vance y Zaerr, 1990).

Heysen y Nabors (1981), encontraron que la concentración de aminoácidos en las células adaptadas a estrés, y su aumento en las células puede funcionar como una estrategia para impedir la penetración de solutos tóxicos y de esta manera tolerar el estrés. Jones *et al.* (1980) mencionan que los aminoácidos hacen una cuantificación significativa (18%), en particular los cambios de prolina relacionados con la disminución en el potencial osmótico y en la turgencia de la planta actuando como soluto compatible con el citoplasma.

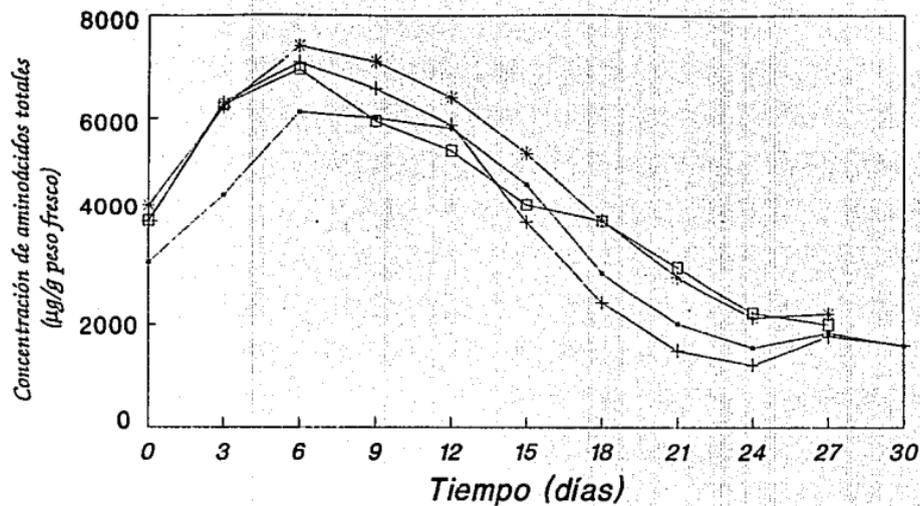


Fig. 15. Concentración de aminoácidos totales durante la cinética del crecimiento de callos (—■— *A. cruentus*; —+— *A. hypochondriacus*) y células en suspensión (---*--- *A. cruentus*; —□— *A. hypochondriacus*). En la figura se muestra la media de los valores obtenidos.

4.3.2 AMARANTINA.

La concentración de amarantina en células y callos de las dos especies de amaranto se pudo cuantificar satisfactoriamente con la metodología descrita en este trabajo. La mayor concentración de amarantina durante toda la cinética de crecimiento fue para los callos de A. hypochondriacus de un máximo de 6.23 mg/g de peso fresco (Fig. 16, Cuadro A.17), ya que en A. cruentus fue de 0.5 mg/g de peso fresco. En las células en suspensión de A. cruentus no se observó más de 0.2 mg/g de P.F. de amarantina. El comportamiento que siguió la concentración de amarantina en la cinética de crecimiento fue de una concentración baja al principio y al final de la curva, y una concentración más alta en la fase lineal y exponencial de la curva. Además se observó la fenolización de la amarantina al final del ciclo de crecimiento, este fenómeno se ha reportado que es debido a la presencia de fitohormonas, deficiencia de fosfato, o alteración en los carbohidratos (Berlin *et al.*, 1986), también se ha reportado que las betacianinas responden a la influencia del pH, la temperatura, oxígeno y la actividad del agua para su producción. (Huang y Von Elbe, 1986). Por otro lado se determinó que éstas se sintetizan como consecuencia de cambios en el estatus hídrico del tejido (trasplante, estrés hídrico y salino o la liberación de éstos), pero si persiste este estrés, es inhibida la producción de betacianinas, tal vez esta respuesta sea un mecanismo asociado al ajuste osmótico. (Velázquez, 1990).

4.3.3 NITRATOS.

La técnica para la cuantificación de nitratos se observó que fue la adecuada, la concentración de nitratos fue similar en las células y callos de ambas especies, es decir, se presentó durante la cinética un aumento y disminución de nitrato (Fig. 17, Cuadro A.18). En estudios con células de Bouvardia ternifolia se ha mencionado que el papel del nitrato es como osmoregulador (Sánchez, E., 1989). También se ha encontrado que en las células en suspensión con diferentes concentraciones de nitrato se presenta el fenómeno de entrada y salida de nitrato, y cuando las células permanecieron

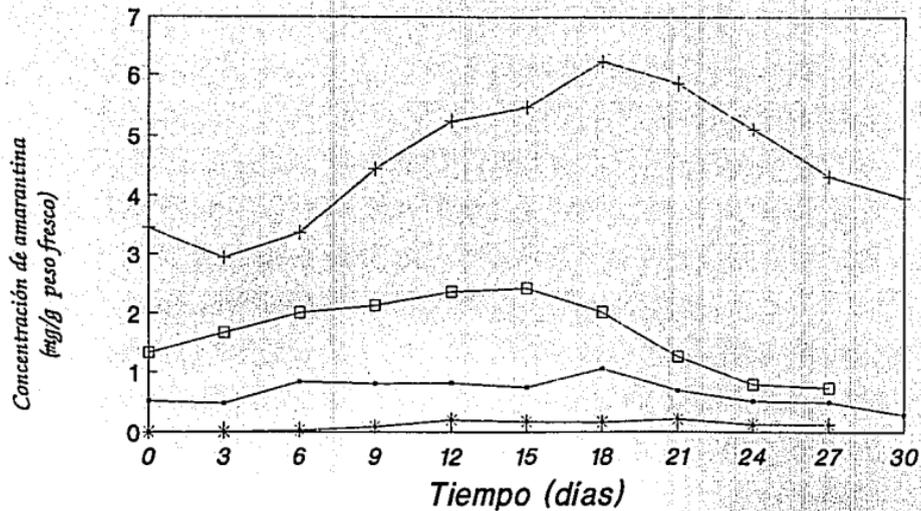


Fig. 16. Concentración de amarantina durante la cinética del crecimiento de callos (—●— *A. cruentus*; —+— *A. hypochondriacus*) y células en suspensión (---*--- *A. cruentus*; —□— *A. hypochondriacus*). En la figura se muestra la media de los valores obtenidos.

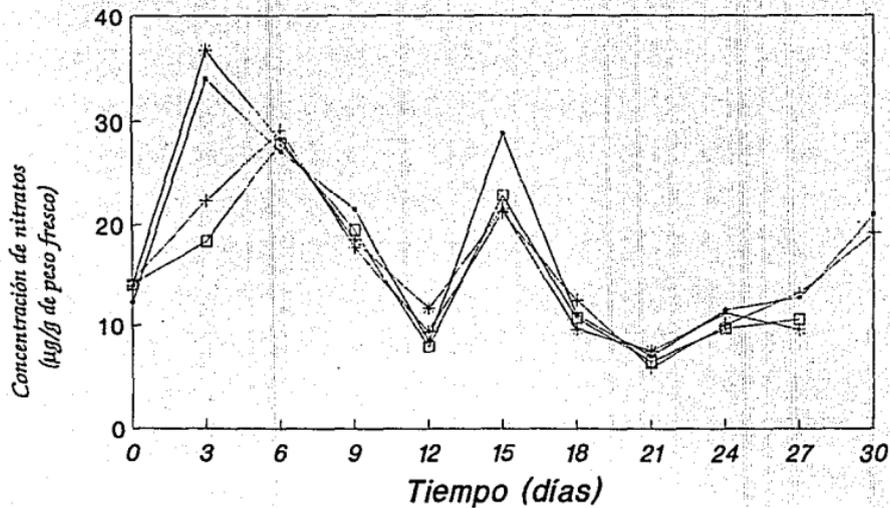


Fig. 17. Concentración de nitratos durante la cinética del crecimiento de callos (—●— *A. cruentus*; —+— *A. hypochondriacus*) y células en suspensión (---*--- *A. cruentus*; ---□--- *A. hypochondriacus*). En la figura se muestra la media de los valores obtenidos.

por más de 24 horas sin nitrato, éstas expulsaron el nitrato que tenían almacenado y después lo volvieron a tomar. También se ha observado que en presencia de potasio aumenta la entrada y salida de nitrato y sin sacarosa ésta disminuye (Gutiérrez, 1990). Heysen y Nabors (1981) observaron que la concentración de nitratos aumenta en las células adaptadas a salinidad. Se cree que el incremento en la concentración de nitrato es debido a una reducción de la actividad de la nitrato reductasa (Jones *et al.*, 1980).

4.3.4 PROTEÍNAS.

La metodología para la cuantificación de proteínas quedó establecida, en los callos y las células en suspensión de ambas especies de amaranto; la cantidad de proteínas se mantuvo más o menos constante durante toda la cinética de crecimiento (Fig. 18, Cuadro A.19). En los callos de *A. cruentus* se observó un incremento en la cantidad de las proteínas entre los 12 y los 21 días, después ésta disminuyó drásticamente, en el caso de callos de *A. hypochondriacus* el incremento de proteínas fue mucho mayor en este mismo periodo. Como se puede observar en la Fig. 15, la concentración de aminoácidos disminuye al mismo tiempo en que se da el incremento de proteínas (Fig. 18), lo cual indica que la disminución en la concentración de aminoácidos se debe a su utilización para la formación de proteínas de las células. También, al igual que los anteriores metabolitos se ha reportado un aumento de proteínas (tres veces más) en células adaptadas a estrés salino que en las células no adaptadas (Ylsiao, 1973; Handa *et al.*, 1983; Irakj *et al.*, 1989). Husemann (1981) reporta que la acumulación de proteínas solubles comienza cuando las células son transferidas a un medio fresco, con lo cual hay una gran demanda de aminoácidos.

4.3.5 REDUCTORES TOTALES Y SACAROSA.

La cuantificación de reductores totales y sacarosa durante la cinética de crecimiento de callos y células en suspensión tuvieron un comportamiento similar, con un incremento en la concentración de ambos en la mitad de la

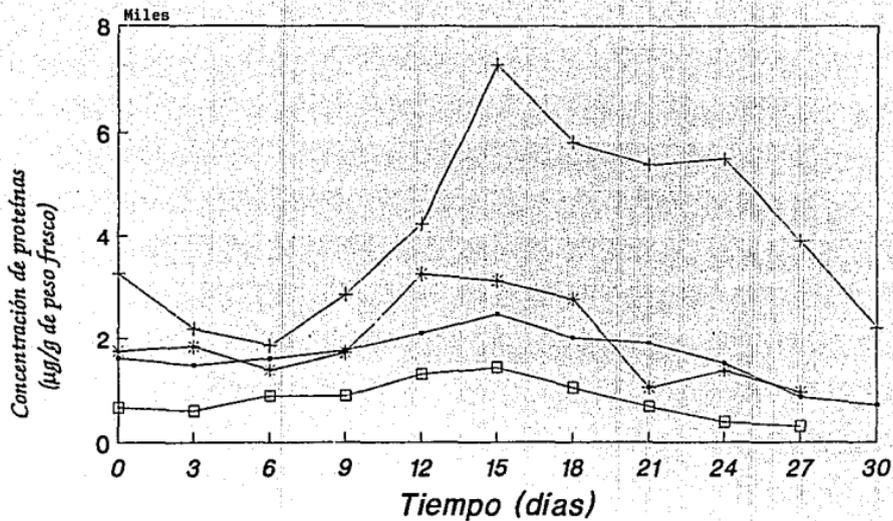


Fig. 18. Concentración de proteínas durante la cinética del crecimiento de callos (—●— *A. cruentus*; —+— *A. hypochondriacus*) y células en suspensión (—*— *A. cruentus*; —□— *A. hypochondriacus*). En la figura se muestra la media de los valores obtenidos.

cinética de crecimiento, es decir, durante la fase lineal (fig. 19 A y B, Cuadro A.20), este incremento en la fase lineal puede indicar que es en esta fase donde se tiene una mayor demanda de azúcares por las células, quizá necesarias para su crecimiento y su posterior multiplicación. Este incremento se ha observado en células sometidas a estrés salino, absorben en la vacuola grandes cantidades de NaCl y en su citoplasma acumulan grandes cantidades de azúcares y aminoácidos con el fin de realizar el ajuste osmótico (Iraki *et al.*, 1989). También se ha mencionado que cuando las células entran en la fase estacionaria del crecimiento hay una acumulación de clorofila, azúcar y almidón. (Hsiao, 1973; Husemann, 1981). Por otra parte se menciona que la concentración de sacarosa y de reductores totales aumenta en las células adaptadas a PEG, contribuyendo de esta manera al ajuste osmótico de las células, sin embargo, el mecanismo por el cual se acumulan aún no se ha establecido, pero puede ser debido a un incremento en la hidrólisis del almidón, su síntesis por otras aminoras, o la conversión en otros productos. (Jones, *et al.*, 1980; Heysen y Nabors, 1981; Hasegawa, *et al.*, 1986).

4.3.6 AMINAS CUATERNARIAS Y GLICINA BETAÍNA.

La metodología para la determinación de aminas cuaternarias y glicina betaína no fue la adecuada, ya que se necesita usar una metodología más sensible, debido a que la concentración de estos metabolitos en los callos y células estudiados es muy pequeña y no se alcanzó a registrar por este método. Es importante establecer bien la metodología para la cuantificación de estos metabolitos, debido a que éstos tienen un comportamiento importante en las células sometidas a estrés, por ejemplo el papel que tiene la glicina betaína es similar al de la prolina antes mencionada y al de los metabolitos antes mencionados sobre su papel en el ajuste osmótico y su influencia en la compartimentalización de los solutos en el citoplasma. (Storey y Wyn-Jones, 1975; Jones, *et al.*, 1980; Hanson y Hitz, 1982; Handa, *et al.*, 1983).

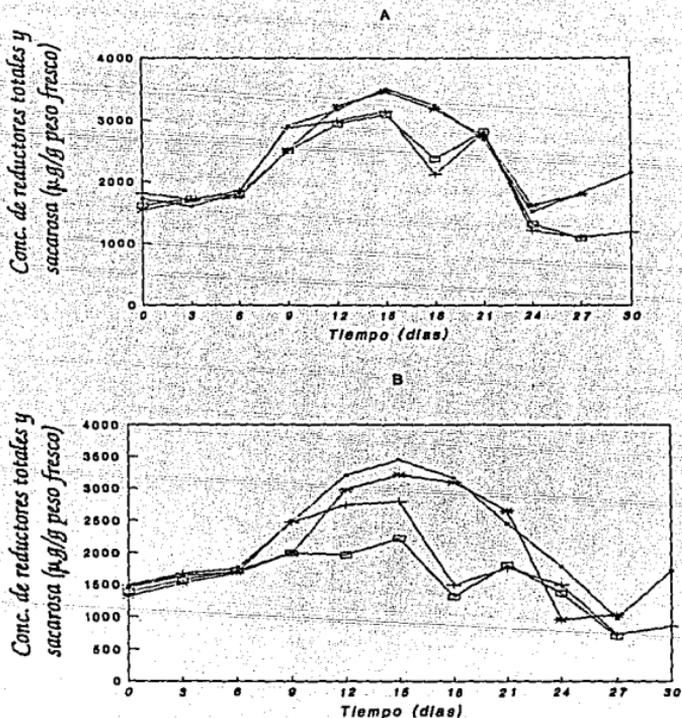


Fig. 19. Concentración de reductores totales y sacarosa en *A. cruentus* (A) y *A. hypochondriacus* (B) durante la cinética de crecimiento de callos (+• Reductores totales; + sacarosa) y células en suspensión (* Reductores totales; * sacarosa). En la figura se muestra la media de los valores obtenidos.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se infieren las siguientes conclusiones:

1. En todos los experimentos las dos especies de amaranto, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*, respondieron en forma similar a los tratamientos a los que fueron sometidos.
2. Para el establecimiento del cultivo aséptico y evitar daños posteriores al explante se sugiere partir de plántulas germinadas en condiciones estériles, siendo necesario para esto la esterilización de las semillas con agua, alcohol, bactericida e hipoclorito de sodio.
3. La respuesta del explante a la inducción de callo varió dependiendo de la edad y tipo de explante empleado. Se sugiere como mejor explante para la inducción de callos las hojas cotiledonarias de plántulas de 7 días posgerminación.
4. Se estableció el cultivo *in vitro* del Amaranto, de esta forma el mejor tratamiento a la inducción de callo (más rápida y mayor cantidad de callo) fue el formado por las sales del medio básico SH más la adición de 2,4-D (1.0 mg/l) y BA (0.5 mg/l), no obstante la inducción de callo se observó en todos los tratamientos empleados, siendo un factor común la presencia de auxina en el medio.
5. Para el mantenimiento y proliferación de los cultivos de callos y células en suspensión, el medio óptimo fue el mismo que se empleó para la inducción.
6. Se estableció la metodología para el seguimiento y cuantificación de la cinética de crecimiento del cultivo de callos y células en suspensión. Como mejor parámetro para su cuantificación se sugiere el peso seco en ambos modelos, células y callos, y el peso fresco también en callos. El comportamiento que siguió la cinética de crecimiento fue una curva del tipo sigmoideal (fase lag o de reposo, fase exponencial, fase lineal y

fase estacionaria), en los callos este ciclo se completó en aproximadamente 27 días y en las células en suspensión en 21 días.

7. El cultivo de amaranto pierde su capacidad morfogénica con los subcultivos subsecuentes, de esta manera sólo se estableció la metodología para formar brotes de callos de dos meses de edad, el medio más apropiado para la inducción está formado por las sales del medio básico SH y la adición de BA (0.5 mg/l¹).
8. Para la elongación de los brotes no fue necesario agregar el 100% de las sales del medio básico SH, de hecho los brotes respondieron mejor (más vigorosos) a los medios compuestos por el 50% de las sales del medio básico SH, en cuanto a la combinación hormonal parece ser que responden mejor a la combinación de auxina (AA) y citocininas (BA).
9. Para la inducción de raíces en los brotes sólo es necesario transferirlos a un medio libre de hormonas, compuesto solamente por las sales del medio básico SH.
10. No se pudo establecer la metodología para la inducción de embriogénesis somática a partir de callos de 2, 5, 7 y 14 meses de edad.
11. Se establecieron las técnicas colorimétricas para la cuantificación de metabolitos durante la cinética de crecimiento de callos y células en suspensión de ambas especies de Amaranto. Los metabolitos evaluados fueron: aminoácidos totales, amarantina, nitratos, proteínas, reductores totales y sacarosa. En el caso particular de la glicina betaina y aminos cuaternarias es necesario modificar la técnica para que pueda registrar los niveles que están presentes en las células en condiciones normales de cultivo. Todos los metabolitos que se evaluaron tienen importancia en el estudio de las respuestas de las plantas y/o de las células vegetales cultivadas in vitro al estrés hídrico y salino.

12. Como conclusión general se puede decir que quedaron establecidas las bases para que el Amaranto pueda ser usado como modelo biológico útil para diversos estudios, por ejemplo morfofénéticos (organogénesis, floración, embriogénesis), fisiológicos (respuestas de las células al estrés y diversos estímulos), así como en la micropropagación y mejoramiento de la especie.

BIBLIOGRAFIA

AITCHISON, P.A., A.J. Macleod, and M. M. Yeoman. 1977. Growth patterns in tissue cultures (callus). In: H.E. Street (ed.). *Plant tissue and Cell Culture*. Gran Bretaña, Blackwell Scientific. 267-306 p.

ALEJANDRE, I.G. F.L. Gómez. 1986a. Ensayo sobre fertilización y densidad de población en Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). In: *Memorias del primer seminario nacional del Amaranto*. Chapingo, México, 125-140p. Compiladores: Trinidad, S.A., Gómez, L.F. y Suárez, R.G.

ALEJANDRE, I.G. y F.L. Gómez. 1986b. Variabilidad en tipos criollos de Amaranto (*Amaranthus* spp.) en la región central de México. In: *Memorias del primer seminario nacional del Amaranto*. Chapingo, México, 242-261p. Compiladores: Trinidad, S.A., Gómez, L.F. y Suárez, R.G.

ALEJANDRE, I.G. y F.L. Gómez. 1986c. Cultivo del Amaranto en México. UACH. Serie Agronomía No. 12. Chapingo, México.

ALLAN, P. 1981. Yearbook, South African Avocado growers Association Natal University, South Africa. 4:22-36p-

ALONI, B. and G. Rosenshtein. 1982. Effect of flooding on tomato cultivars: The relationship between proline accumulation and other morphological and physiological changes. *Physiol. Plant.* 56: 512-517.

ALVARADO, G.O.G. 1990. Caracterización *in vitro* de la tolerancia de *Chenopodium* Willd. a la salinidad (NaCl). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 112 pp.

BAĞGA, S., K. Venkateswarlu, and S.K. Sopory. 1987. *In vitro* regeneration of plants from hypocotyl-segments of *Amaranthus paniculatus*. *Plant, Cell Reports.* 6: 186-187.

BERLIN, J., S. Sieg, D. Strack, M. Bokern, and H. Harms. 1986. Production of betalains by suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 5: 163-174.

BIDWELL, R.G.S. 1979. *Fisiología Vegetal*. AGT Editor. México. 784 pp.

BRESSAN, R.A., P.M. Hasegawa, and A.K. Handa. 1981. Resistance of cultures higher plants cells to polyethylen glycol induced water stress. *Plant. Sci. lett.* 21: 23-30.

BRESSAN, R.A., A.K. Handa, S. Handa, and P.M. Hasegawa. 1982. Growth and water relations parameters of cultures tomato cells after adjustment to low external water potencial. *Plant. Physiol.* 70: 1303-1309.

BURNOFF-RADOSEVICH, M. and C. Paupardin. 1985. Vegetative propagation of *Chenopodium quinoa* by shoot tip culture. *Amer. J. Bot.* 72(2): 278-283.

CAPLIN, S.M. 1963. Effect of initial size on growth of plant tissue cultures. *Amer. J. Bot.* 50: 91-94.

CATALDO, D.A., M. Haroom, L.E. Schrader, and V.L. Youngs. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Science and plant analysis* 6(1): 71-80.

COCKING, E.C. and E.W. Jen. 154. Estimation of aminoacids by ninhydrin. *Biochem J.* XLV.

DODDS and Roberts. 1982. *Experiments in plant tissue culture*. USA Cambridge, University Press. 178pp.

ESPITIA, R.E. 1986. Situación actual y problemática del cultivo del Amaranto en México. In: *Memorias del primer seminario nacional del Amaranto*. Chapingo, México. 101-198. Compiladores: Trinidad S.A., Gómez L.F. y Suárez R.G.

ESPINOSA, R.E. 1986. Plagas y enfermedades del cultivo del Amarantho (*Amaranthus* spp.) en México. In: Memorias del primer seminario nacional del Amarantho. Chapingo, México. 233-238. Compiladores: Trinidad, S.A., Gómez, L.F. y Suárez, R.G.

ESAU, K. 1976. Anatomía Vegetal. Barcelona, España. Omega, S.A. 779 pp.

EVANS, D.A. 1983. Handbook of plant cell culture. Vol. 1. Mc Millan. Publishing Company, N.Y.

EVANS, D.A., W.R. Sharp and C.E. Flick. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. In: Thorpe, T.A. (ed.) Plant tissue culture-methods and applications in agriculture. USA. Academic Press, Inc. 45-113 pp.

EVERETT, N.P., M.J. Wach, and D.J. Ashworth. 1985. Biochemical markers of embryogenesis in tissue cultures of de maiza INBRED B73. Plant Science. 41: 133-140.

FEINJE, B.L., R.R. Harwood, C.S. Kauffman, and J.P. Senft. 1979. Amaranthi Gentle Giant of the past and the future. In: New Agricultural Crops. A.A.A.S. selected symposium 38. Westview Press. Colorado 41-63p.

FLORES, H.E., A. Thier and A.W. Galston 1982. *In vitro* culture of grain and vegetable amaranthi (*Amaranthus* spp). Amer. J. bot. 69 (7): 1049-1054.

FLOWERS, T.L.J., P.F. Troke, and A.R. Yeo. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. Annu. Rev. Plant Physiol. 28: 89-121.

GAMBORG, G.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell. Res. 50: 148-151.

GAMBORG, O.L. 1976. Plant tissue culture media. *In vitro* 12(7): 4473-4478.

GARCIA, A.M. 1967. *Enfermedades de las plantas de la República Mexicana*. Limusa-Wiley, S.A. D.F., México. 93pp.

GOLDSMITH, M.H. M. 1977. *The polar transport of auxina*. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 28: 439-478.

GOMEZ, L.F. 1986. *Cultivo del Amaranto en México*. In: *Memorias del primer seminario nacional del Amaranto*. Chapingo, México. 90-100p. *Compiladores: Trinidad, S.A., Gómez, L.F. y Suárez, R.G.*

GOODWIN, T.W. and E.I. Mercer. 1986. *Introduction to Plant Biochemistry*. Pergamon Press. Gran Bretaña. 677 pp.

GRANADOS, S.D. y G.R. López, 1986. *Chinampas: historia y etnobotánica de la 'alegría'...* In: *Memorias del primer seminario nacional del Amaranto*. Chapingo, México. 23-55 pp. *Compiladores: Trinidad, S.A., Gómez, L. F. y Suárez, R.G.*

GREENWAY, H. and R. Munns, 1980. *Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes*. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 149-190.

GRUBBEN, G.J. and D.J. Sloten. 1979. *Genetic resources of Amaranthus: a global plan of action international board for plant genetic resources, VI*. Rome, Italy. 57 pp.

GUTIERREZ, R.M. 1990. *Entrada y salida de nitrato en el cultivo en suspensión de Bouvardia tenifolia*. Tesis profesional (Biología). Fac. de Ciencias, UNAM. 67 pp.

HANDA, S., R.A., Bressan, A.K. Handa, N.C. Carpita, and P.M. Hasegawa 1983. *Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress*. *Plant Physiol.* 73: 834-843.

HANDA, A.K., R.A. Bressan, and P.M. Hasegawa 1982. *Characteristics of cultured tomato cells after prolonged exposure to medio containing polyethylen glycol*. *Plant Physiol.* 69: 514-521.

HANDA, A.K., R.A. Bressan, S. Handa, and P.M. Hasegawa. 1983. Clonal variation for tolerance to polyethylene glycol induced water stress in cultured tomato cells. *Plant Physiol.* 72: 645-653.

HANSON, A.D. and W.D. Hitz. 1982. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 163-203.

HANSON, A.D., N.E. Hoffman, and C. Samper. 1986. Identifying and manipulating metabolic stress-resistance traits. *Hortscience* 21 (6): 1313-1316.

HASEGAWA, P.M., R.A. Bressan, and A.K. Handa. 1986. Cellular mechanisms of salinity tolerance. *Hortscience* 21(6): 1317-1323.

HEJSEK, W.J. and M.W. Nabors. 1981. Growth, water content, and solute accumulation of two tobacco cell lines cultured on Sodium Chloride, Dextran and Polyethylene glycol. *Plant Physiology.* 68: 1454 - 1459.

HSIAO, T.C. 1973. Plant responses to water deficit. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 519-570.

HUANG, A.S. and J.H. Von Elbe. 1986. Stability comparison of two betacyanine pigments - Amaranthine and Betanine. *J. of food science.* (5163): 670-674.

HUSEMANN, W. 1981. Growth characteristics of hormone and vitamin independent photoautotrophic cell suspension cultures from Chenopodium rubrum. *Protoplasma* 109: 415-431.

HUZINKER, A.T. 1943. Las especies alimenticias de Amaranthus y Chenopodium cultivadas por los indios de América. *Rev. Arg. Agron.* 10(4): 297-359.

HURTADO, M.D. y E.M. Merino 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas, D.F., México. 232 pp.

IRAKI, N.M., R.A. Bressan, P.M. Hasegawa and N. C. Carpita. 1989. Alteration of the physical and chemical structure of the primary cell wall of growth-limited plant cells adapted to osmotic stress. *Plant Physiol.* 91: 39-47.

JANKIEWICZ, S.L. 1989. Desarrollo vegetal, sustancias reguladoras. *UACH. México.* 121 pp.

JONES, M.M., C.B. Osmond, and N.C. Turner. 1980. Accumulation of solutes in leaves of Sorghum and Sunflower in response to water deficits. *Aust. J. Plant Physiol.* 7: 193-205.

KRJEJK, D.T. 1984. Somatic cell genetics: prospects for development of stress tolerance. *Hortscience.* 19: 2-3.

LEITHAM, D.S. and L.M.S. Palni. 1983. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34: 163-197.

LEINSMAYER, E.M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of Tobacco cultures. *Physiol Plant.* 18: 100-127.

LOPEZ, M.M. 1989. Avances y perspectivas del mejoramiento genético enfocado a aumentar la resistencia a la sequía en plantas. Tesis profesional (Biología). Fac. de Ciencias. UNAM 161 pp.

MARPEZ, S. 1986. Una revisión sobre la utilización del género *Amaranthus* en México. In: Memorias del primer seminario nacional del Amarantho. Chiapingo. México. 65-76p. Compiladores: Trinidad, S.A., Gómez, L.F. y Suárez, R.G.

MARQUEZ, S.F. 1986. Generalidades sobre el establecimiento de un programa inmediato de mejoramiento genético en Amarantho. In: Memorias del primer seminario nacional del Amarantho. Chiapingo. México. 217-224 p. Compiladores: Trinidad, S.A., Gómez, L.F. y Suárez, R.G.

MARX, J.L. 1978. Amarantho: un regreso a la comida de los Aztecas. *Interciencia* 3(1): 54-56.

MORALES, P.J., D.S. Granados y J.J.H. Martínez. 1986. Respuesta del Amarantho (*Amaranthus hypochondriacus* L.) a la fertilización química y orgánica en condiciones de temporal en dos áreas del estado de Tlaxcala. In: *Memorias del primer seminario nacional del Amarantho*. Chapingo, México. 152-174 p. *Compiladores: Trinidad, S.A., Gómez, L.F. y Suárez, R.G.*

MURASHIGE, T. and F. Skoog, 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: 125-166.

MURASHIGE, T. 1977. Current status of plant cell and organ cultures. *Hortscience*. 12: 127-130.

MURASHIGE, T. 1979. Plant tissue culture and its importance to agriculture. In: *Practical tissue culture applications*. Academic Press, Inc. 27-44 p.

NARAYANASWAMY, S. 1977. Regeneration of plants from tissue cultures, In: J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (eds.). *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. Germany, Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg. 179-247 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1984. *Amaranth: Modern prospects for an Ancient Crop*. National Academy Press. Washington, D.C.

OREA, L.J. y S.A. Trinidad. 1986. Respuesta de dos genotipos de *A. hypochondriacus* L. (Verde y Rojo) a diferentes dosis de N y P en la producción de proteína foliar. In: *Memorias del primer seminario nacional del Amarantho*. Chapingo, México, 179-185. *Compiladores: Trinidad, S.A. Gómez, L.F. y Suárez, R.G.*

PETERSON, G.L. 1979. Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Roselo, Farr and Randall. *Anal. biochem* 100: 201-220.

QUINTEIRO, R.R. (compilador). 1985. *Perspectivas de la biotecnología en México*. Fundación Javier Barrios Sierra A.C.-CONACYT. 499 pp.

REYNA, T.T. 1986. *Requerimientos climáticos para el cultivo del amaranto (Amaranthus spp.) en México*. In: *Memorias del primer seminario nacional del Amaranto*. Chapingo, México. 81-89 p. *Compiladores: Trinidad, S.A. Gómez, L.F. y Suárez, R.G.*

ROBERTI, M.L. y V.M. Loyola (compiladores). 1985. *El cultivo de tejidos vegetales en México*. CICY-CONACYT. 167 pp.

SALISBURY, F.B. and G.W. Ross, 1985. *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Co., Belmont, California. 54 pp.

SANCHEZ, E.A.M. 1989. *El posible papel del nitrato como osmoregulador en células de Bouvardia ternifolia*. Tesis profesional (Biología). Fac. de Ciencias, UNAM. 67 pp.

SANCHEZ-MARROQUIN, A. 1986. *Perspectivas biotecnológicas del sistema amaranto*. In: *Memorias del primer seminario nacional del Amaranto*. Chapingo, México. 554-574 p. *Compiladores: Trinidad, S.A., Gómez, L.F. y Suárez, R.G.*

SANTACRUZ, H.U. y N.M. Marban. 1986. *Asociación de Nacobbus aberrans a 3 variedades de alegría (A. hypochondriacus)* In: *Memorias del primer seminario nacional del Amaranto*. Chapingo, México. 186-192 p. *Compiladores: Trinidad, S.A., Gómez, L.F. y Suárez, R.G.*

SCHENK, R.V. and A.C. Hildebrandt. 1972. *Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures*. *Can. J. bot.* 50: 199-204.

SCORZA, R. 1982. *In vitro* flowering. *Horticulture Review*. 4: 106-127 p.

SERRATO, C.M.A. y A.E.G. Vega. 1986. Bioensayos en órganos *Amaranthus hypochondriacus*, efecto de la miel de abeja. In: Memorias del primer seminario nacional del Amaranto. Chapingo, México. 262-273 p. Compiladores: Trinidad, S.A., Gómez, L.F. y Suárez, R.G.

SINGER, S.R. and McDaniel. 1986. Analyzing growth in cell cultures. I y II. Can. J. bot. 64: 233-241.

SKOOG, F. and C.O. Miller. 1967. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultures *in vitro*. In: W.M. Laetsch and R.E. Cleland. Papers on plant growth and development. USA. Little, Brown and Company (Inc.) 241-251 p.

STAVAREK, S.J. and R.W. Rains. 1985. Effect of salinity on growth and maintenance costs of plant cells. In: Cell and Mol. Biol. of plant stress. A.R. Liss (Ed.). Academic Press, Inc. USA. 129-143 p.

STEWART, F.C. 1968. Solutes in Cells: Their responses during growth and development in F.C. Stewart (Ed). Plant Physiol. a treatise. Vol. IX. Water and solutes in plants. N.Y. Academic Press. 551-594 p.

STREET, H.E. 1979. Embryogenesis and chemically induced organogenesis. In: Sharp, W.R. et al., (eds.). Plant Cell and tissue culture-principles and applications. USA. Ohio State University Press. 123-153 p.

STREET, H.E. 1977. Introduction. In: Street, H.E. (eds.). Plant Tissue and culture. Great Britain. Blackwell Scientific Publications. 61-102 p.

STUMPF, D.K. 1984. Quantitation and purification of quaternary ammonium compounds from halophyte tissue. Plant. Physiol. 75: 273-274 p.

SUAREZ, R.G. 1986. Avances de investigación sobre Amaranto en el ITESM-U. Qro. In: Memorias del primer seminario nacional del Amaranto. Chapingo, México. 175-178 p. Compiladores: Trinidad, S.A., Gómez, L.F. y Suárez, R.G.

SZANICAWSKI, R.K. 1987. Plant, stress and homeostasis. *Plant Physiol. Biochem.* 25(1): 63-71.

TAYLOR, J.A. and D.W. West. 1980. The use of Evan's blue stain to test the survival of plant cell after exposure to high salt and high osmotic pressure. *J. Exp. Bot.* 31(121): 571-576.

THORPE, T.A. 1978. Physiological and Biochemical aspects of organogenesis *in vitro*. In: T.A. Thorpe (ed.) *Frontiers of plant tissue culture*, University of Calgary offset printing services. Calgary, Canadá. 49-58 pp.

TISSERAT, B. and B.D. Galletta. 1988. *In vitro* flowering in *Amaranthus*. *Hortscience* 23(1): 210-213.

TRAN THANH VAN, K.M. 1981. Control of morphogenesis. In: *In vitro* cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 291-311.

TRINIDAD, S.A., E.D. Medina y F.M. Vera. 1986. Utilización de fertilizantes en el cultivo del Amaranto (*Amaranthus* spp.) In: *Memorias del primer seminario nacional del Amaranto*. Chapingo, México. 110-117 p. Compiladores: Trinidad, S.A., Gómez, L.F. y Suárez, R.G.

TRUCKER, J.B. 1986. Amaranth: The once and future crop. *Bioscience* 36(1): 9-12.

VALENZUELA, S.E. 1989. Influencia del contenido relativo de agua sobre los niveles de los solutos compatibles, glicina betaína y prolina durante la pérdida de agua en *A. hypochondriacus* L. Tesis Maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica). Fac. Química. UNAM, México.

VASIL, K., W.R. Scovcroft and K.J. Frey, (ed.). 1982. *Plant improvement and somatic cell genetics*. Academic Press. N.J. 300 pp.

VELAZQUEZ, M.M.I. 1990. Cambio en la concentración de betacianinas bajo estrés hídrico y salino en *Amaranthus* sp. Tesis profesional (Biología). Fac. de Ciencias. UNAM.

VILLALOBOS, A.V. (compilador). 1985. *Fundamentos teórico-prácticos de cultivo de tejidos vegetales*. C.P. - F.A.O. México.

WAIN, R.L. and C.W. Fawcett. 1969. *Chemical plant growth regulation*. In: F.C. Steward. *Plant Physiology - A treatise*, Vol. IX. NY: Academic Press, Inc. 231-296 p.

WAREING, P.F. and T. Al-Chalabi. 1985. *Determination in plant cells*. *Biol. Plantarum*. 27: 241-248.

WELLER, T.A. and L.L. Lasure. 1981. *Betalains in beet root tissue culture*. *J. of Food Sciencie*. 47: 162-163.

WILSON, J.R. and M.M. Ludlow. 1983. *Time trends of solute accumulation and the influence of Potassium fertilizer on Osmotic adjustment of water-stressed leaves of three tropical grasses*. *Aust. J. Plant Physiol.* 10: 523-537.

MANUAL DE PRACTICAS DE BIOQUIMICA I. 1989. *Facultad de Química. UNAM, México*.

*APPENDICE
SECCION A*

CUADRO A.1 Composición básica de los medios de cultivo empleados para el cultivo *in vitro* de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

Nombre	Compuesto Fórmula	Concentración mg ^l		
		MS	SH	B _s
Macronutrientes				
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	.	.	.
Nitrato de potasio	KNO ₃	1650	2500	2500
Cloruro de calcio	CaCl ₂ ·2H ₂ O	.	200	150
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1900	400	250
Fosfato de potasio	KH ₂ PO ₄	.	.	.
Fosfato de sodio	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	440	.	150
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	.	.	134
Fosfato de amonio	NH ₄ H ₂ PO ₄	370	300	.
Micronutrientes				
Acido bórico	H ₃ BO ₃	170.2	5	10
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ ·4H ₂ O	.3	10	3
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	.6	1	2
Yoduro de potasio	KI	.83	1	0.75
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	.25	0.1	0.25
Sulfato de cobre	CuSO ₄ ·5H ₂ O	6.025	0.2	0.025
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O	22.025	0.1	0.025
Sulfato ferroso	FeSO ₄ ·7H ₂ O	8.8	20	27.8
EDTA (2Na)	C ₁₀ H ₁₆ N ₄ O ₁₀ Na ₂ ·2H ₂ O	0.3	15	37.3
Otros factores de crecimiento	C ₂ H ₁₂ O ₆	0	1000	100
Mio-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	0.5	15	1
Acido Nicotínico	C ₆ H ₁₁	27.5	0.5	10
Piridoxina-HCl	C ₈ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂ ·H ₂ O	37.1	5	1
Tiamina-HCl				
Fuente de carbono		100	3%	
Sacarosa		0	0.8%	
Agar		0	5.7	
pH		0		

Tomado de: Murashige y Skoog, 1962; Gamborg *et al.*, 1968; y Schenk y Hildebrandt, 1972.

CUADRO A.1 Tratamientos utilizados en el estudio de la esterilización de Semillas de *A. cruentus* (A.C.) y *A. hypochondriacus* (A.H.). Media de los valores \pm error estándar del porcentaje de contaminación y germinación.

Tratamientos	Contaminación (%)		Germinación (%)	
	A.C.	A.H.	A.C.	A.H.
1a	15 \pm 3.5	9 \pm 3.0	92 \pm 7.0	90 \pm 4.2
1b	12 \pm 4.1	3 \pm 1.1	92 \pm 4.1	95 \pm 3.7
1c	9 \pm 2.0	0	90 \pm 5.3	91 \pm 3.3
2a	3 \pm 1.2	0	56 \pm 6.0	73 \pm 2.7
2b	0	0	51 \pm 2.5	79 \pm 2.9
2c	0	0	48 \pm 3.0	70 \pm 6.0
3a	27 \pm 3.7	31 \pm 3.2	85 \pm 4.0	86 \pm 4.1
3b	29 \pm 5.1	30 \pm 2.9	83 \pm 10.1	88 \pm 3.9
3c	20 \pm 2.9	26 \pm 3.1	89 \pm 7.3	84 \pm 2.9
4a	27 \pm 6.3	26 \pm 4.0	83 \pm 6.1	74 \pm 5.7
4b	25 \pm 4.8	23 \pm 5.6	86 \pm 3.9	70 \pm 5.3
4c	20 \pm 3.7	19 \pm 2.9	80 \pm 7.3	69 \pm 6.1
5a	51 \pm 6.1	48 \pm 3.3	92 \pm 2.9	94 \pm 3.5
5b	53 \pm 6.0	40 \pm 6.0	90 \pm 8.0	93 \pm 8.4
5c	42 \pm 5.2	39 \pm 5.3	91 \pm 10.3	93 \pm 2.3
6a	64 \pm 4.3	59 \pm 4.9	90 \pm 6.5	95 \pm 6.0
6b	63 \pm 5.9	53 \pm 4.2	92 \pm 3.7	95 \pm 5.3
6c	43 \pm 6.1	48 \pm 3.5	92 \pm 4.6	94 \pm 6.2
7a	93 \pm 9.3	85 \pm 6.9	92 \pm 3.9	95 \pm 3.1
7b	82 \pm 8.1	82 \pm 7.7	90 \pm 7.2	95 \pm 5.7
7c	79 \pm 6.3	76 \pm 5.2	92 \pm 7.0	93 \pm 6.9

Descripción de tratamientos en el Cuadro 2.

CUADRO 3.3 Efecto de diferentes medios básicos y concentraciones y combinaciones hormonales sobre la inducción de callo en *A. cruentus* (A.C.) y *A. hypochondriacus* (A.H.).

Tratamientos	Inicio de formación de callo (Días) *		Formación de callo (%) *	
	A.C.	A.H.	A.C.	A.H.
1	5.2±1.0 A	4.3±0.6 A	98±1.2 A	100±0 A
2	8.3±0.8 B	6.1±1.0 AB	95±2.1 AB	93±4.1 AB
3	7.6±0.7 B	5.2±0.8 AB	87±3.2 B	82±6.2 B
4	7.1±1.1 AB	6.2±0.9 AB	82±2.8 B	79±3.1 B
5	6.4±1.3 AB	6.0±1.0 AB	100±0 A	100±0 A
6	9.0±0.8 BC	7.2±0.8 B	91±3.0 B	97±2.2 A
7	7.0±1.4 AB	6.5±0.7 B	93±2.5 AB	96±1.9 AB
8	8.2±1.0 B	6.3±1.1 AB	79±4.5 B	82±2.8 B
9	4.2±0.7 A	4.6±1.2 A	100±0 A	100±0 A
10	6.1±0.9 AB	5.1±0.9 AB	84±3.7 B	89±3.3 B
11	5.3±1.2 A	5.0±1.1 AB	97±2.0 A	88±2.2 A
12	5.2±1.0 A	6.4±1.1 B	86±3.2 B	89±2.6 B

* = media de los valores ± error estándar.

Las letras representan las separación de medias por la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). En cada columna la misma letra representa valores estadísticamente iguales.

Descripción de tratamientos en el cuadro 4.

CUADRO A.4 Cinética del crecimiento de callos de *A. cruentus* desarrollados en los medios MS(1), B₅(5) y SH(9). Media de los valores ± error estándar.

Días	Tratamientos					
	MS (1)		B ₅ (5)		SH (9)	
	PF (g)	PS (mg)	PF (g)	PS (mg)	PF (g)	PS (mg)
0	0.5±.01	20±2.5	0.5±.01	20±2.5	0.5±.01	20±2.5
3	0.54±.05	24±3.4	0.54±.03	24±3.6	0.53±.03	24±2.0
6	0.68±.03	26±3.2	0.59±.03	25±3.5	0.73±.02	28±3.3
9	0.98±.09	32±5.6	0.98±.05	29±4.2	1.22±.15	43±2.8
12	1.53±.10	43±4.7	1.72±.09	58±3.9	2.16±.19	71±3.8
15	2.96±.19	103±5.1	2.60±.15	110±6.5	3.26±.28	113±4.1
18	3.54±.25	132±5.3	2.97±.18	128±8.3	3.62±.23	135±3.9
21	3.73±.29	183±8.4	3.49±.09	171±5.1	3.89±.35	182±3.6
24	3.49±.23	146±9.1	3.50±.23	149±5.7	4.52±.37	189±3.5
27	4.26±.31	173±7.3	3.38±.32	145±9.1	4.25±.51	183±9.3
30	4.01±.30	163±6.3	3.30±.31	162±9.6	4.20±.52	179±6.9

PS = Peso seco ; PF = Peso fresco.

Descripción de tratamientos. Cuadro 4.

CUADRO A.5 Cinética del crecimiento de callos de *A. hypochondriacus* desarrollados en los medios de cultivo MS(1), B₅(5) y SH(9). Media de los valores ± error estándar.

Días	Tratamientos					
	MS (1)		B ₅ (5)		SH (9)	
	PF (g)	PS (mg)	PF (g)	PS (mg)	PF (g)	PS (mg)
0	0.5±.01	20±2.5	0.5±.01	20±2.5	0.5±.01	20±2.5
3	0.55±.03	23±3.1	0.55±.05	24±2.9	0.55±.06	24±3.1
6	0.73±.07	24±3.6	0.74±.05	29±3.3	0.74±.21	28±3.1
9	1.38±.10	35±3.7	1.23±.07	42±3.6	1.82±.33	47±3.7
12	2.39±.09	6.7±5.2	2.08±.11	71±4.0	2.54±.41	83±4.0
15	2.78±.21	104±4.9	3.14±.15	109±3.8	3.57±.29	127±8.0
18	3.76±.19	128±5.0	3.50±.15	140±3.8	4.13±.38	169±3.9
21	4.08±.32	169±7.3	3.75±.09	183±5.3	4.84±.41	200±4.5
24	4.37±.30	169±8.6	3.96±.26	189±9.3	5.09±.53	212±6.1
27	4.36±.31	187±7.3	3.91±.23	195±9.6	5.23±.48	213±9.3
30	4.25±.30	182±6.4	3.52±.25	181±9.1	5.10±.33	210±9.5

PS = Peso seco ; PF = Peso fresco

Descripción de tratamientos. Cuadro 4.

CUADRO A.6 Cinética del crecimiento de callos de *A. cruentus* desarrollados en el medio básico SH y diferentes combinaciones y concentraciones hormonales.

Días	Tratamientos *									
	9		9a		9b		9c		9d	
	PF(g)	PS(mg)	PF(g)	PS(mg)	PF(g)	PS(mg)	PF(g)	PS(mg)	PF(g)	PS(mg)
0	0.5±.01	20±2.5	0.5±.01	20±2.5	0.5±.01	20±2.5	0.5±.01	20±2.5	0.5±.01	21±2.5
3	0.52±.03	24±2.8	0.52±.03	24±2.6	0.53±.03	23±2.6	0.52±.03	24±2.7	0.49±.02	24±2.8
6	0.73±.03	28±3.1	0.74±.03	27±3.1	0.72±.04	28±2.6	0.73±.05	27±2.8	0.64±.03	28±2.8
9	1.23±.06	43±2.8	1.16±.04	43±3.3	1.49±.05	45±3.1	1.59±.09	44±3.0	1.08±.05	41±3.3
12	2.16±.06	72±4.1	2.10±.09	71±3.5	1.97±.05	69±2.9	2.03±.08	70±3.1	1.52±.10	64±3.5
15	3.26±.12	110±3.9	2.99±.10	108±4.1	2.65±.10	89±3.0	2.68±.15	88±3.0	1.97±.10	76±3.4
18	3.64±.16	136±4.3	3.51±.09	138±5.3	2.87±.09	111±4.2	3.04±.12	126±3.0	2.30±.11	82±4.1
21	3.89±.15	181±4.2	3.85±.10	179±4.9	3.18±.09	122±4.5	3.62±.12	135±3.9	2.70±.11	85±4.7
24	4.52±.21	189±5.3	4.09±.15	181±4.3	3.56±.10	145±6.2	3.99±.15	172±4.3	2.99±.14	89±5.3
27	4.50±.20	189±4.9	4.08±.15	181±5.1	3.56±.12	144±6.4	3.99±.19	172±3.8	2.93±.14	83±5.0
30	4.29±.20	185±6.1	4.09±.18	181±5.6	3.52±.21	146±6.1	3.97±.19	172±4.2	2.96±.19	87±5.1

PF = Peso fresco; PS = Peso seco.

* Media de valores ± error estándar.

Descripción de Tratamientos. Cuadro 5.

CUADRO A.7 Cinética del crecimiento de callos de *A. hypochondriacus* desarrollados en el medio básico SH y diferentes combinaciones y concentraciones hormonales.

Días	Tratamientos *									
	9		9a		9b		9c		9d	
	PF(g)	PS(mg)	PF(g)	PS(mg)	PF(g)	PS(mg)	PF(g)	PS(mg)	PF(g)	PS(mg)
0	0.5±.01	20±2.5	0.5±.01	20±2.5	0.5±.01	20±2.5	0.5±.01	20±2.5	0.5±.01	20±2.5
3	0.54±.03	24±2.5	0.55±.06	24±2.7	0.49±.01	23±2.5	0.54±.02	24±2.8	0.5±.01	24±2.6
6	0.73±.05	28±2.9	0.76±.06	29±3.3	0.74±.03	29±3.0	0.75±.05	28±2.9	0.63±.01	25±2.6
9	1.80±.08	46±2.8	1.59±.06	43±2.9	0.99±.03	42±3.2	1.72±.06	45±3.5	0.99±.03	39±2.9
12	2.56±.10	83±3.1	2.18±.07	75±6.5	1.96±.09	78±3.5	2.35±.13	78±3.7	1.86±.06	70±3.3
15	3.55±.12	122±3.9	3.50±.09	121±3.4	3.06±.12	120±3.5	3.49±.10	122±3.6	2.15±.09	73±3.9
18	4.10±.13	167±4.5	4.02±.16	161±3.9	3.32±.13	152±4.0	4.03±.10	161±3.8	2.75±.10	89±4.2
21	4.81±.13	201±4.5	4.56±.10	193±4.7	3.73±.13	180±4.1	4.72±.13	202±3.8	3.01±.13	92±4.3
24	5.04±.18	209±5.3	4.87±.14	199±4.8	3.74±.13	180±4.0	4.95±.13	203±4.3	3.51±.13	126±0.1
27	5.10±.21	208±6.1	4.70±.16	196±5.3	3.72±.12	179±4.0	4.99±.21	205±4.9	3.46±.12	128±5.9
30	5.06±.24	209±5.9	4.59±.23	197±5.2	3.70±.16	179±3.9	4.98±.31	203±5.4	3.39±.13	124±6.2

PF = Peso fresco; PS = Peso seco.

* Media de valores ± error estándar

Descripción de tratamientos. Cuadro 5.

CUADRO A.8 Cinética del crecimiento de células en suspensión de *A. cruentus* desarrollados en los medios de cultivo MS(1), B₂(5) y SH(9).

Días	Tratamientos *					
	MS(1)		B ₂ (5)		SH(9)	
	PF(g)	PS(mg)	PF(g)	PS(mg)	PF(g)	PS(mg)
0	5±.01	13±1.0	.25±.01	13±1.0	.25±.01	13±1.0
3	.24±.07	12±1.9	.23±.04	12±1.5	.23±.03	13±2.3
6	.49±.05	38±3.3	.53±.06	41±2.6	.58±.02	47±3.4
9	1.87±.09	79±2.9	1.63±.06	65±3.0	2.26±.09	99±2.9
12	2.71±.12	132±3.0	2.94±.18	138±2.9	4.38±.10	183±4.5
15	3.49±.23	166±3.9	3.61±.22	171±3.8	5.61±.26	209±3.9
18	4.60±.30	182±4.5	3.99±.29	184±5.4	6.44±.29	236±4.3
21	5.19±.43	206±6.3	4.62±.29	194±5.8	6.37±.37	233±5.6
24	5.14±.38	205±5.7	4.58±.32	197±6.1	6.19±.35	223±5.7
27	5.18±.40	205±8.4	4.57±.30	196±7.4	6.19±.41	223±5.7

PF = Peso fresco; PS = Peso seco.

* Media de los valores ± error estándar.

Descripción de tratamientos. Cuadro 4.

CUADRO A.9 Cinética del crecimiento de células en suspensión de *A. hypochondriacus* desarrollados en los medios de cultivo MS(1), B₂(5) y SH(9).

Días	Tratamientos *					
	MS(1)		B ₂ (5)		SH(9)	
	PF(g)	PS(mg)	PF(g)	PS(mg)	PF(g)	PS(mg)
0	.25±.01	13±1.0	.25±.01	13±1.0	.25±.01	13±1.0
3	.22±.06	12±2.7	.24±.04	13±2.1	.22±.05	12±1.8
6	.46±.09	46±2.4	.49±.08	47±2.4	.57±.09	48±2.7
9	.99±.11	88±3.3	1.06±.17	92±3.6	3.20±.17	143±2.9
12	2.03±.19	126±3.8	2.05±.22	128±3.9	5.73±.28	216±3.5
15	2.74±.28	154±4.0	2.92±.22	156±4.3	6.10±.34	221±3.6
18	3.59±.33	221±4.6	3.61±.34	222±4.3	7.08±.37	271±3.6
21	4.85±.31	229±5.7	4.42±.35	228±4.5	6.99±.49	270±4.5
24	4.83±.40	226±5.3	4.18±.38	224±4.0	6.54±.63	265±4.8
27	4.79±.39	224±5.4	4.31±.35	226±5.1	6.48±.58	264±5.1

PF = Peso fresco; PS = Peso seco.

* Media de los valores ± error estándar.

Descripción de tratamientos. Cuadro 4.

CUADRO A.10 Número de células durante la cinética del crecimiento del cultivo de células en suspensión de A. cruentus y A. hypochondriacus en el medio 9 (SH+BA+2,4-D).

Días	# de células/25 ml de medio	
	<u>A. Cruentus</u>	<u>A. Hypochondriacus</u>
0	13972 ± 630	15918 ± 549
3	29193 ± 1200	32376 ± 1574
6	54296 ± 5315	63129 ± 3692
9	125249 ± 6214	148221 ± 8206
12	221367 ± 9319	326295 ± 10537
15	399468 ± 13966	496114 ± 17921
18	532847 ± 15272	564192 ± 24169
21	597431 ± 16883	674821 ± 19895
24	571494 ± 14319	672214 ± 22438
27	575712 ± 21145	674212 ± 24096

* Media de los valores obtenidos ± error estándar.

CUADRO A.11 Volumen del paquete celular durante la cinética del crecimiento del cultivo de células en suspensión de A. hypochondriacus en el medio 9 (SH+BA+2,4-D).

Días	% del volumen del paquete celular/25 ml de medio	
	<u>A. Cruentus</u>	<u>A. Hypochondriacus</u>
0	1.8 ± 0.5	1.8 ± 0.3
3	3.6 ± 1.2	5.4 ± 1.2
6	9.7 ± 3.0	16.9 ± 3.5
9	19.9 ± 3.9	34.2 ± 6.1
12	22.5 ± 4.5	39.7 ± 5.9
15	31.3 ± 6.3	46.3 ± 12.3
18	43.7 ± 8.7	51.5 ± 11.7
21	49.5 ± 11.3	54.3 ± 15.4
24	48.3 ± 11.9	56.2 ± 13.7
27	47.6 ± 14.2	51.9 ± 13.9

* Media de los valores obtenidos ± error estándar.

CUADRO A.12 Porcentaje de viabilidad de las células en suspensión durante la cinética del crecimiento de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* en el medio 9 (SH+BA+2,4-D).

Días	% de viabilidad	
	<i>A. cruentus</i>	<i>A. hypochondriacus</i>
0	80 ± 13	81 ± 12
3	75 ± 12	79 ± 16
6	79 ± 15	81 ± 13
9	82 ± 12	83 ± 12
12	81 ± 18	83 ± 16
15	83 ± 14	84 ± 14
18	82 ± 16	83 ± 14
21	82 ± 13	82 ± 14
24	80 ± 16	80 ± 17
27	71 ± 15	72 ± 21
30	61 ± 21	56 ± 20

* Media de valores ± error estándar.

CUADRO A.13 Efecto de diferentes combinaciones hormonales en la inducción de brotes a partir de callos de *A. cruentus* (A.C.) y *A. hypochondriacus* (A.H.)

Tratamientos	# brotes/frasco *		% formación de brotes/tratamiento *	
	A.C.	A.H.	A.C.	A.H.
20	5.1 ± 1.72	20.0 ± 1.63 A	10.0 ± 0.52	80.0 ± 1.32 A
21	1.1 ± 0.25	10.3 ± 1.91 AB	6.0 ± 0.38	76.0 ± 0.92 AB
22	1.0 ± 0.16	10.1 ± 1.63 AB	5.0 ± 0.61	80.0 ± 0.89 AB
23	0 ± 0.16	0	0	0
24	0	5.6 ± 0.36 B	0	63.0 ± 0.47 AB
25	3.5 ± 0.46	3.0 ± 0.39 B	3.0 ± 0.46	48.0 ± 0.66 B
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	4.1 ± 1.80	10.1 ± 0.84 AB	6.0 ± 0.39	52.0 ± 0.39 B
29	0	6.7 ± 1.52 B	0	36.0 ± 0.65 B
30	0	4.3 ± 0.73 B	0	50.0 ± 0.39 B
31	2.2 ± 0.54	3.3 ± 0.36 B	4.0 ± 0.45	38.0 ± 0.72 B

* Media de los valores ± error estándar.

Descripción de tratamientos. Cuadro 6.

Las letras (A,B) representan la separación de medias por la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). La misma letra representa valores estadísticamente iguales.

CUADRO A.14 Efecto de diferentes combinaciones hormonales y concentraciones de sales del medio SH sobre el crecimiento de brotes de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

Tratamiento	Incremento de la longitud del brote		
	<i>A. cruentus</i> *	<i>A. hypochondriacus</i> *	
32	.81 ± .21 A	.52 ± .12 A	A
33	.82 ± .16 A	.47 ± .13 A	A
34	.61 ± .17 AB	.49 ± .18 A	A
35	.31 ± .17 B	.12 ± .08 B	B
36	.31 ± .13 B	.36 ± .16 AB	AB
37	.42 ± .12 B	.25 ± .14 B	B
38	.35 ± .18 B	.28 ± .12 B	B
39	.19 ± .11 B	.18 ± .12 B	B
40	.73 ± .14 A	.67 ± .21 A	A
41	.71 ± .09 A	.62 ± .20 A	A
42	.65 ± .16 AB	.81 ± .33 A	A
43	.23 ± .14 B	.20 ± .09 B	B
44	.37 ± .20 B	.18 ± .07 B	B
45	.30 ± .11 B	.16 ± .10 B	B
46	.30 ± .17 B	.15 ± .09 B	B
47	.21 ± .16 B	.10 ± .05 B	B
48	.89 ± .19 A	.79 ± .18 A	A
49	.82 ± .21 A	.63 ± .21 A	A
50	.99 ± .24 A	.69 ± .14 A	A
51	.30 ± .16 B	.31 ± .14 B	B
52	1.05 ± .24 A	.94 ± .21 A	A
53	1.22 ± .28 A	.98 ± .23 A	A
54	1.73 ± .31 A	1.04 ± .31 A	A
55	.34 ± .13 B	.38 ± .16 AB	AB
56	.52 ± .26 B	.24 ± .10 B	B
57	.61 ± .21 AB	.26 ± .11 B	B
58	.52 ± .24 B	.20 ± .09 B	B
59	.30 ± .17 B	.16 ± .09 B	B

* Media de valores ± error estándar.

Descripción de tratamientos en el Cuadro 7.

Las letras (A,B) representan la separación de las medias por la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). La misma letra representa valores estadísticamente iguales.

CUADRO A.15 Efecto de diferentes tipos y concentraciones de auxinas en la inducción de raíces en brotes de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

Tratamientos	# raíces / brote *		% formación raíces / tratamiento *	
	<i>A. cruentus</i>	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>A. cruentus</i>	<i>A. hypochondriacus</i>
60	25.6 ± 1.7	27.3 ± 2.3	98 ± 0.5	93 ± 1.0
61	21.3 ± 2.4	20.5 ± 1.9	95 ± 1.2	89 ± 0.8
62	12.4 ± 1.0	10.2 ± 1.7	80 ± 0.9	80 ± 1.0
63	18.2 ± 1.3	15.7 ± 1.3	63 ± 2.2	91 ± 1.7
64	10.5 ± 1.1	9.9 ± 0.9	75 ± 3.0	83 ± 2.6

* Media de los valores ± error estándar.

Descripción de tratamientos en el Cuadro 9.

CUADRO A.16 Concentración de aminoácidos totales durante la cinética del crecimiento de callos y células en suspensión de *A. cruentus* (A.C.) y *A. hypochondriacus* (A.H.).

Días	Callos µg/g Peso fresco		Células µg/g Peso fresco	
	A.C.	A.H.	A.C.	A.H.
0	3197	3997	4315	4015
3	4512	6315	6218	6265
6	6121	7112	7415	6971
9	6012	6589	7124	5946
12	5814	5873	6415	5372
15	4721	3980	5319	4324
18	2986	2421	4010	3994
21	2014	1513	2918	3100
24	1573	1227	2124	2218
27	1845	1796	2200	1997
30	1612	1620		

CUADRO A.17 Concentración de amarantina durante la cinética del crecimiento de callos y células en suspensión de A. cruentus (A.C.) y A. hypochondriacus. (A.H.)

Días	Callos $\mu\text{g/g}$ Peso fresco		Células $\mu\text{g/g}$ Peso fresco	
	A.C.	A.H.	A.C.	A.H.
0	0.51	3.46	0	1.32
3	0.47	2.93	0	1.67
6	0.83	3.38	0.03	2.01
9	0.80	4.45	0.09	2.13
12	0.81	5.26	0.20	2.36
15	0.74	5.49	0.17	2.42
18	1.06	6.23	0.16	2.02
21	0.69	5.87	0.21	1.27
24	0.51	5.12	0.13	0.79
27	0.49	4.33	0.13	0.73
30	0.28	3.97		

CUADRO A.18 Concentración de nitratos durante la cinética del crecimiento de callos y células en suspensión de A. cruentus (A.C.) y A. hypochondriacus. (A.H.)

Días	Callos $\mu\text{g/g}$ Peso fresco		Células $\mu\text{g/g}$ Peso fresco	
	A.C.	A.H.	A.C.	A.H.
0	12.4	14.6	14.1	14.2
3	34.1	22.3	36.7	18.4
6	27.1	29.1	28.3	27.9
9	21.4	17.8	18.5	19.4
12	8.4	9.3	11.7	7.8
15	28.9	21.2	21.5	22.8
18	11.0	12.5	9.6	10.7
21	6.9	5.8	7.4	6.4
24	11.5	10.0	11.2	9.7
27	12.8	13.3	9.6	10.6
30	21.0	19.3		

CUADRO A.19 Concentración de proteínas durante la cinética del crecimiento de callos y células en suspensión de *A. cruentus* (A.C.) y *A. hypochondriacus*. (A.H.)

Días	Callos $\mu\text{g/g}$ Peso fresco		Células $\mu\text{g/g}$ Peso fresco	
	A.C.	A.H.	A.C.	A.H.
0	1627	3272	1746	653
3	1491	2197	1840	591
6	1622	1865	1395	896
9	1762	2874	1726	898
12	2116	4236	3269	1314
15	2482	7274	3135	1448
18	2021	5826	2791	1055
21	1914	5368	1055	388
24	1534	5485	1392	383
27	879	3912	973	303
30	720	2215		

CUADRO A.20 Concentración de reductores totales y sacarosa durante la cinética del crecimiento de callos y células en suspensión de (A) *A. cruentus* (A.C.) y (B) *A. hypochondriacus* (A.H.).

Días	Callos $\mu\text{g/g}$ Peso fresco		Células $\mu\text{g/g}$ Peso fresco		
	Reductores Totales	Sacarosa	Reductores Totales	Sacarosa	
(A)	0	1721	1814	1540	1617
	3	1600	1712	1690	1720
	6	1814	1849	1749	1800
	9	2912	2879	2512	2500
	12	3173	2998	3229	2946
	15	3512	3146	3463	3096
	18	3240	2120	3184	2370
	21	2684	2814	2740	2819
	24	1521	1215	1620	1320
	27	1819	1100	1804	1091
	30	2143	1191		
(B)	0	1458	1486	1320	1389
	3	1637	1673	1519	1569
	6	1695	1748	1682	1714
	9	2486	2472	1998	1996
	12	3205	2739	2979	1964
	15	3451	2796	3211	2224
	18	3162	1495	3093	1312
	21	2451	1759	2651	1808
	24	1785	1493	946	1364
	27	474	721	1029	638
	30	1715	849		

*APPENDICE
SECCION B*

PREPARACION DE REACTIVOS

Aminoácidos totales.

Preparación del reactivo de Ninhidrina

Reactivo A Buffer de citratos 0.2 M (5.0±1) agregar por cada 50 ml de buffer 0.08 g de SnCl_2

Reactivo B Tomar 10 ml de reactivo A y agregarle 0.4 g de ninhidrina previamente disuelta en 10 ml de etilen glico-monometil-eter. (en oscuridad).

Aminas cuaternarias y glicina betaina.

Para activar la resina Dowex-50W se lavó con alcohol etílico caliente (al 96%), después con agua desionizada y se le agregó HCl 0.1 M durante 1 hr., finalmente se neutralizó lavando con agua desionizada (aproximadamente 6 veces).

Reactivo de Dragendoff Mezclar partes iguales de KJ 2.45 M y BiNO_3 0.35 M

Nitratos.

El ácido salicílico se disuelve con ácido sulfúrico concentrado.

Proteínas.

Reactivo A Mezclar en partes iguales CTC, dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, hidróxido de amonio (NH_4OH) 0.8 N y agua desionizada.

CTC = Na_2CO_3 (10%) + $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1%) + Tartrato de Na y K (0.2%).

Reactivo B Reactivo de Folin-Ciocalteus (1:7).

Reductores totales y sacarosa.

Reactivo I Solución A. *Disolver en 80 ml de agua, 2.5 g de carbonato de sodio anhidro, 2.5 g de tartrato de sodio y potasio, 2.0 g de bicarbonato de sodio, 20 g de sulfato de sodio anhidro, diluir a 100 ml y filtrar.*

Solución B. *Disolver en 50 ml de agua que contenga 50 ml de ácido sulfúrico concentrado 7.5 g de sulfato de cobre pentahidratado.*

Reactivo I *1 ml de solución B + 25 ml de solución A (prepararlo minutos antes de hacer la determinación).*

Reactivo II *Disolver 45 ml de agua que contenga 2.1 ml de ácido sulfúrico concentrado, 2.5 g de Molibdato de amonio. Aparte disolver en 2.5 ml de agua, 0.3 g de arsenato de sodio heptahidratado y agregarlos a la solución anterior, despacio y con agitación constante, aforar a 50 ml e incubar en baño de agua a 55°C durante 30 min.*