

FALLA DE ORIGEN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



**"RESCATE DE EMBRIONES IN VITRO DE MARACUYA
(Passiflora edulis D. var flavicarpa)"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRICOLA
P R E S E N T A :
ALEJANDRO CARRILLO TELLO

ASESOR: ING. FRANCISCO CRUZ PIZARRO



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN. N. A. M.
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR FACULTAD DE ESTUDIOS
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FEB-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Rescate de embriones in vitro de Maracuya (*Passiflora edulis*,
D. var flavicarpa)".

que presenta el pasante: Alejandro Carrillo Tello
con número de cuenta: 8100168-0 para obtener el TITULO de
Ingeniero Agrícola.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 21 de Agosto de 1995

PRESIDENTE	Ing. <u>Hilda Carina Gómez Villacorta</u>	<u>Hilda Carina Gómez Villacorta</u>
VOCAL	Biol. <u>Elba Martínez Holguín</u>	<u>Elba Martínez Holguín</u>
SECRETARIO	Ing. <u>Francisco Cruz Pizarro</u>	<u>Francisco Cruz Pizarro</u>
PRIMER SUPLENTE	Ing. <u>César Maycotte Morales</u>	<u>César Maycotte Morales</u>
SEGUNDO SUPLENTE	Ing. <u>Abel Rodríguez Bueno</u>	<u>Abel Rodríguez Bueno</u>

AGRADECIMIENTOS

- **A la Universidad Nacional Autónoma de México:** Por darme la oportunidad de formarme profesionalmente.
- **A la Ingeniera Hilda Karina Gómez Villar:** Por sus acertadas observaciones en la realización de este trabajo.
- **A la Bióloga Elva Martínez Holguín:** Por su valiosa colaboración y apoyo.
- **Al Ingeniero Francisco Cruz Pizarro:** Por haberme brindado sus conocimientos e invertebrados en la dirección de esta tesis.
- **Al Ingeniero Cesar Mycotte Morales:** Por su amistad y acertadas observaciones.
- **Al Ingeniero Abel Rodríguez Bueno:** Por sus valiosas observaciones.

DEDICATORIAS

- **A la memoria de mi padre: Lic. Humberto Carrillo Olivares:** Que no me ha dejado ni, dejará de acompañarme en ningún momento de mi vida; le dedico este trabajo, ya que sin su apoyo y sus enseñanzas no hubiera podido llegar a alcanzar esta meta.
- **A mi madre: Lic. Maria Tello Vda. de Carrillo:** Quien me ha enseñado la nobleza y apreciar el valor de las cosas, con fortaleza hacer frente a las adversidades sin doblegarse.
- **A mis hermanos: Ma. Soledad, Elvia, Humberto, Olivia y Adrián** a los cuales les debo cariño y el apoyo que me han brindado durante todo este tiempo.
- **A la memoria de mis tias Enriqueta Tello Romero e Isalia Carrillo Olivares,**
- **A mi primo, amigo y compañero, Ing. Humberto Valdés Carrillo.**
- **A todos mis tios, con afecto**

- A Claudia, por su compañía y apoyo a lo largo de este tiempo los cuales me han ayudado a superarme día a día. Gracias.
- A mis amigos: Augusto, Jose Alberto, Mauricio, Miguel, Eduardo, Alberto H., Alberto F., Miguel L. Por su apoyo. Gracias.
- A mis compañeros: Ricardo, Jose Luis, Max, Jesús, Moises, Ana, Tanis, Rúben, Manuel, Alfredo, Fernando, Trini, Noé, Toño, Roberto y a todos los que compartieron experiencias a lo largo de la carrera. Gracias.

LLEVA TU CULTURA DISCRETAMENTE,
COMO LLEVAS EL RELOJ EN EL BOLSILLO,
SIN SACARLO A CADA RATO.
SIMPLEMENTE PARA DEMOSTRAR QUE LO
TIENES. SI TE PREGUNTAN QUE HORA ES,
DILO; PERO NO LO PROCLAMES
CONTINUAMENTE Y SIN QUE TE
PREGUNTEN, COMO HACE EL SERENO.

Lord Chesterfield

INDICE

	PAGS.
INDICE DE CUADROS	I
INDICE DE FIGURAS	II
INDICE DE GRAFICAS	III
RESUMEN	IV
I.- INTRODUCCION	1
II.- OBJETIVOS	3
III.- REVISION BIBLIOGRAFICA	
3.- CARACTERISTICAS DEL CULTIVO DEL MARACUYA	4
3.1.- ORIGEN	4
3.2.- CLASIFICACION TAXONOMICA	6
3.3.- DESCRIPCION BOTANICA	7
3.4.- CONDICIONES ECOLOGICAS	11
3.5.- PROPAGACION	11
3.5.1.- REPRODUCCION SEXUAL	11
3.5.2.- MULTIPLICACION ASEJUAL	12
3.5.2.1.- ESTACADO	12
3.5.2.2.- ACODO	13
3.5.2.3.- INJERTO	13
3.5.3.- POLINIZACION	14
3.5.4.- PROPAGACION IN VITRO	16
3.5.4.1.- FASES O ESTADOS DEL CULTIVO IN VITRO	17
3.5.4.1.1.- FASE CERO "0"	18

3.5.4.1.2.- FASE "1" ESTABLECIMIENTO ASEPTICO	18
3.5.4.1.3.- FASE "2" MULTIPLICACION	20
3.5.4.1.4.- FASE "3" ENRAIZAMIENTO	20
3.5.4.1.5.- FASE "4" ACLIMATAACION	21
3.6.- RESCATE DE EMBRIONES	22
3.6.1.- CULTIVO DE EMBRIONES INMADUROS	23
3.6.2.- CULTIVO DE EMBRIONES MADUROS	23
3.6.3.- USOS DEL RESCATE DE EMBRIONES IN VITRO	25
3.7.- MEDIO DE CULTIVO	28
3.7.1.- SALES INORGANICAS	29
3.7.1.1.- MACRONUTRIENTES	29
3.7.1.2.- MICROELEMENTOS	31
3.7.2.- AGENTES QUELATOS	33
3.7.3.- VITAMINAS	33
3.7.4.- AMINOACIDOS	34
3.7.5.- CARBOHIDRATOS	34
3.7.6.- ANTIOXIDANTES	34
3.7.7.- AGUA	35
3.7.8.- AGENTES GELIFICANTES	35
3.7.9.- REGULADORES DE CRECIMIENTO	36
3.7.10.- REGULADORES DE CRECIMIENTO EN EL CULTIVO DE EMBRIONES <i>IN VITRO</i>	37
3.8.- GERMINACION	38
3.9.-DORMICION	39

IV.- MATERIALES Y METODOS	
4.1.- UBICACION DEL EXPERIMENTO	44
4.2.- ESTABLECIMIENTO	44
4.3.- EXPERIMENTO PREVIO	45
4.4.- DESARROLLO DEL BIOENSAYO	47
4.4.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL	49
4.4.2.- TOMA DE DATOS	49
4.5.- RESCATE DE EMBRIONES IN VITRO DE MARACUYA (<i>Passiflora edulis</i> ; <i>D. var flavicarpa</i>)	50
4.5.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL	54
4.5.2.- TOMA DE DATOS	55
V.- RESULTADOS Y DISCUSION	
5.1.- INHIBICION DE EL COLEPTILO	55
5.2.- CULTIVO DE EMBRIONES IN VITRO DE MARACUYA	62
5.2.1.- CONTAMINACION	62
5.2.2.- GERMINACION DE EMBRIONES	64
VI.- CONCLUSIONES	67
VII.- BIBLIOGRAFIA	69

INDICE DE CUADROS

CUADRO NO.		PAGS.
1	CLASIFICACION TAXONOMICA	6
2	CLASIFICACION DE DORMICION	42
3	TRATAMIENTOS DE EL EXPERIMENTO PREV.	45
4	MEDIO DE CULTIVO (MURASHIGE Y SKOOG)	52
5	ENLONGACION DEL COLEOPTILO	55
6	ANDEVA. INHIBICION DE COLEOPTILO	57
7	COMPARACION DE MEDIAS (TUKEY AL .05)	58

INDICE DE FIGURAS

FIGURA No.		PAG.
1 a, b	FLOR DEL MARACUYA	9
1 c, d, e	FRUTO Y SEMILLA DEL MARACUYA	10
2	TIPOS DE FLOR	15
3 a	PREPARACION DE LOS COLEOPTILOS	47
3 b	PREPARACION DE LOS MACERADOS	48
4 a	EXTRACCION DE LOS SACOS EMBRIONARIOS	50
4 b	DESINFECCION DE LOS SACOS EMBRIONARIOS	51
4 c	SIEMBRA DE LOS EMBRIONES	53

INDICE DE GRAFICAS

GRAFICA No.		PAG.
1	RESULTADOS DE EL EXPERIMENTO PREV	46
2	INHIBICION DEL COLEOPTILO DE TRIGO	56
3	INDICE DE CONTAMINACION	58
4	PORCENTAJE DE GERMINACION	60

RESUMEN

El maracuya es una fruta tropical, la cual puede ser consumida en diferentes formas tales como: helados, ates, licores, néctares, mermeladas, refrescos, concentrados y pulpa.

Entre sus formas de propagación, encontramos que, la reproducción sexual, es la forma más usada aunque también, puede utilizarse la multiplicación asexual. La primera tiene como desventaja lo tardado del proceso que llega a ser hasta 3 meses, y por el contrario en la reproducción asexual suele ser más rápida, sin embargo, existe mayor probabilidad de infección producida por hongos.

El presente trabajo pretende ser una alternativa para eliminar los dos problemas existentes en ambas formas de propagación del maracuya, por medio de la técnica de rescate de embriones in vitro la cual nos permite obtener plantas en menor tiempo que de la forma tradicional y libres de infecciones como lo es en el caso de la reproducción asexual.

El presente se dividió en tres partes. La primera parte que constó de un experimento previo en el cual se sembraron semillas de maracuya completas, y semillas sin testa y embriones; en medio de cultivo de Murashige y Skoog al 50% de su concentración de sus sales minerales, utilizando un arreglo completamente al azar.

La segunda parte constó de un bioensayo para determinar qué estructura de la semilla de maracuya impide la germinación de la misma, utilizando un bioensayo de la inhibición de coleóptilo de trigo, regado con extractos de macerados de las diferentes estructuras de la semilla del maracuya, semilla completa, testa, embrión con saco embrionario, embrión y testigo.

La tercera parte consta del rescate de embriones de maracuya in vitro, sembrados en medio de cultivo de Murashige y Skoog.

De esta forma se encontró que en la primera parte, el tratamiento que más se desarrolló fue el del embrión con un 100% de germinación a los 9 días.

En la segunda parte se obtuvo un mayor desarrollo del coleóptilo de trigo en los tratamientos regados con los extractos de: saco embrionario con embrión, embrión, testa y por último semilla completa.

Por último en la tercera parte se obtuvo un 21.20% de contaminación y un 77.3 % de germinación creando plantas viables de los embriones.

INTRODUCCION

El maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) es una planta originaria del Brasil; su demanda en Norteamérica y Europa se ha incrementado, ganando prestigio como fruta "exótica", situación que la ha colocado en un lugar promisorio y rentable en términos de mercadeo. En México el interés por su cultivo y utilización ha ido en aumento, sin embargo para que tenga éxito económico, es necesario conjuntar un buen desarrollo agronómico con la producción de frutos que reúnan los atributos físicos y químicos demandados para su comercialización y aplicación tecnológica.

En México, probablemente se introdujo desde 1975 en el Estado de Guerrero (Banafunzi, 1978), encontrándose actualmente cultivos comerciales en diversos Estados de la República y muy recientemente en Morelos.

De igual manera su utilización también se ha visto incrementada, siendo posible encontrarla en el mercado como fruta fresca y en diversos productos procesados.

Es fuente de proteínas, minerales, vitaminas, carbohidratos y grasas. Se consume como fruta o en jugo y se utiliza para preparar refrescos, néctares, yoghurts, mermeladas, licores, helados, pudines, enlatados, pastelería, confitería, y para mezclas con jugos con otros tipos de frutas como cítricos, guayaba, piña, etc.

La composición típica de la fruta de maracuyá es la siguiente: cáscara 50-60%, jugo 30-40%, semillas 10-15%, siendo el jugo el producto de mayor importancia.

No todas las semillas germinan fácilmente; algunas presentan ciertos mecanismos que les impiden hacerlo. Estas semillas se conocen como durmientes o latentes, y para germinar requieren de un manejo especial que muchas veces incluye un tratamiento pregerminativo.

Hay plantas en las que ya se ha conseguido que germinen sus semillas durmientes, pero hay muchas otras en las que se desconoce la manera de lograrlo, incluso frecuentemente se ignoran los mecanismos que convierten en durmientes a las semillas de una planta dada.

Desde el punto de vista agronómico resulta lógico que la elección del tratamiento para que germinen las semillas durmientes de una determinada especie debe hacerse con base en el mecanismo inhibidor presente.

En cuanto a las semillas del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, D), estas presentan una dormancia o latencia, la cual provoca que las semillas retarden su tiempo de germinación, debido a la alta concentración de inhibidores de crecimiento en las diferentes estructuras que las conforman.

En la propagación del material, generalmente se emplean las semillas, aunque este procedimiento trae como consecuencia una gran variabilidad en el orden genético del material obtenido. (Medina, 1980).

Siendo la reproducción sexual la más segura en cuanto a la resistencia de enfermedades ya que, uno de los problemas principales de la multiplicación asexual es el alto número de plantas infectadas por enfermedades, por lo tanto la reproducción sexual es la más segura ya que ha dado mejores resultados para la obtención de portainjertos pero con la desventaja de un largo periodo de germinación.

Este problema puede ser eliminado por medio de la técnica de rescate de embriones *in vitro*. Esta técnica, permite rescatar los embriones de maracuyá y, de esta forma se pueden regenerar plantas que ahora si están en posibilidades de servir como progenitores en los programas de mejoramiento. Sin embargo, la adecuación de las técnicas *in vitro* para el rescate de embriones, involucra la desinfección, la ruptura de la latencia del embrión y la de el medio de cultivo.

OBJETIVOS

- Determinar de una manera cualitativa en base a un bioensayo, dentro de cuál estructura de la semilla de maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*.D) se encuentra la mayor cantidad del inhibidor, ácido abscísico (ABA).
- Acelerar el proceso de germinación de las semillas de maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. D.) por medio de la técnica de rescate de embriones *in vitro* para obtener planta de mejor calidad.
- Generar mayor información sobre el cultivo del maracuyá y sobre la potencialidad del uso de la técnica del "rescate de embriones *in vitro*".

III REVISION BIBLIOGRAFICA.

3.- CARACTERISTICAS DEL CULTIVO DEL MARACUYA (*Passiflora edulis*. *Degener* var. *flavicarpa*).

3.1.- ORIGEN.

La *Passiflora edulis* que se caracteriza por frutos morados es nativa del Brasil; la variedad *flavicarpa* se asume que pertenece a la misma especie, con características morfológicas y de crecimiento propias que lo hacen peculiar.

Estas diferencias según León (1987), se deben tal vez a la cruce entre un híbrido de *P. edulis* y otra especie, una mutación, o una población diferente introducida directamente de América Tropical a Australia.

El Maracuyá (*Passiflora edulis*. var. *Flavicarpa*. D.) en Brasil atrajo la atención de los españoles a principios del siglo XVI; los frailes españoles la tomaron como emblema de la pasión de Cristo por las diferentes partes de la flor y la nombraron "Flor de las cinco yagas" o "Flor passionis" o "Flor de la Pasión". En la cual según ellos se representaba la crucifixión de Cristo.

Ahora cerca de 400 años después de haberse descubierto, el cultivo de la fruta de la pasión amarilla es practicada en todos los países con clima tropical húmedo (Von Loeseck, 1942, citado por Jagtlan, J. y col, 1988).

El género *Passiflora*, incluye numerosas especies que se cultivan tanto en zonas cálidas como zonas frías. La granadilla maracuyá (*Passiflora edulis*) de piel morada es una fruta de clima tropical y probablemente entre las granadillas la que mayor difusión ha tenido en

el mundo, ya se cultiva en forma comercial en : India, Brasil, Australia, Venezuela, Kenya, Nueva Zelandia, Nueva Guinea, República del Sur de Africa, Indonesia y Malasia.

La *Passiflora edulis*. var. *flavicarpa*. de piel amarilla se cultiva en América del Sur, E.U.A.,(Hawai), Australia y Centro América (Arriola y Menchu, 1976).

En Australia el fruto de la pasión púrpura era cultivado anteriormente en los campos abandonados de plátano, alcanzando, gran importancia hasta 1943, cuando se extendió la invasión del hongo *Fusarium oxysporum* provocando el marchitamiento y matando a las plantas.

El uso de la fruta de la pasión amarilla, la cual es resistente al ataque del marchitamiento producido por *F. oxysporum* ha permitido a la industria reconstruirse. Sin embargo los híbridos del púrpura con el amarillo son más resistentes a problemas con enfermedades. (Fruit world and Market Grower, 1963).

3.2 CLASIFICACION TAXONOMICA.

CUADRO 1

CLASE:	Angiospermae
SUBCLASE:	Dicotyledoneae
SUPERORDEN:	Dilénidae
ORDEN:	Violales
FAMILIA:	Pasifloráceae
GENERO:	<i>Passiflora</i>
ESPECIE:	<i>edulis</i>
VARIEDAD:	<i>flavicarpa</i>
NOMBRE COMUN:	Maracuyá

Fuente: Taylor, G. y cols. 1971

3.3.- DESCRIPCION BOTANICA.

Es una trepadora perenne, de tallo cilíndrico o ligeramente anguloso, cuando es joven sus tallos son lisos, de color verde claro o verde oscuro, provisto de zarcillos axilares, redondos, enrollados en forma de espiral, de 20-40 centímetros de largo. Las hojas se encuentran en peciolo de mediana longitud, alternas, estipuladas subcoriáceas tribuladas con bordes aserrados, de color verde oscuro en lado superior, de 8-16 centímetros de largo, trinervada, con nervaduras laterales prominentes. Cerca de la inserción de la lámina, el peciolo tiene 2 nectarios o glándulas cortas. (fig. 1a)

Flores vistosas, entomofilas, axilares, solitarias, hermafroditas, de unos 5 centímetros de diámetro, tienen pétalos y sépalos amarillentos y los filamentos de la corona finos y ondulados, con la mitad inferior morada y la superior blanca. El androceo y el gineceo se insertan sobre un andróginofo columnar bien desarrollado. Androceo formado por 5 estambres con filamentos libres e insertos debajo de la base del ovario, color verde amarillento; anteras transversales, móviles, de dos celdas grandes elíptica, de color verde claro. El gineceo constituido por un ovario, color amarillo claro, ovoide estilos clavados de color verde claro, de 1 centímetro de largo; estigmas reniforme y cordiforme, de color verde claro y de .5 centímetro de diámetro. En la base de la flor se encuentran tres brácteas bien desarrolladas. (fig. 1b y 1c)

Los frutos son bayas, globosas u ovoides con la base y el ápice redondeado, de color amarillo corteza dura y de pericarpio poco grueso, conteniendo numerosas semillas, cada una de las cuales está rodeada de una membrana mucilaginoso (arilo) que contiene un jugo aromático. (Avilan y Leal., 1989). (fig. 1d, 1e)

La semilla de las passifloras como muchas otras está compuesta por: un embrión que es la parte de la semilla que da origen al nuevo vegetal. En las semillas maduras el embrión es rudimentario, es decir muy pequeño y poco diferenciado. (op. cit.)

El eje embrionario es un tejido de forma alargada con un meristemo en cada punta, presenta una o más hojas modificadas llamadas cotiledones. (Camacho, 1994)

El extremo del embrión que da origen al tallo de la planta y que tiene el meristemo cubierto con primordios de hojas se conoce como epicótilo; la parte del embrión que está entre la unión de los cotiledones con el eje y el meristemo que da origen a la raíz de la radícula se llama hipocótilo.(op.cit.)

Los tejidos nutritivos tienen la función de alimentar al embrión hasta que la fotosíntesis cubre las necesidades de la planta y es conocido como endospermo y es digerido durante la maduración de la semilla. (Camacho, 1994.)

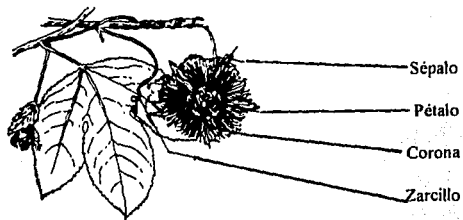
Al conjunto formado por el embrión y los tejidos nutritivos, se le llama almendra. (op.cit)

Las cubiertas formadas a partir de las envolturas del óvulo se llaman testa (externa) y tegmen (interna); generalmente están demasiado unidas que resulta difícil distinguir una de la otra.(Camacho, 1994)

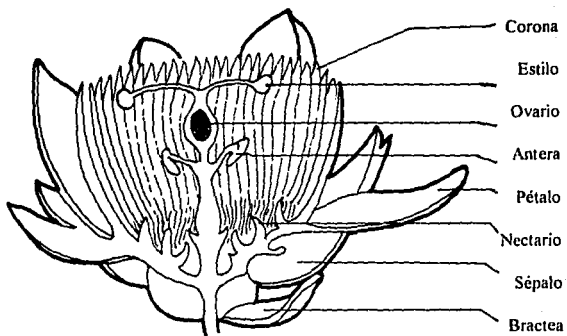
Sobre la testa se observa el hilio, que es la cicatriz que deja la inserción del funículo en el óvulo, y el micropilo, que es una pequeña perforación por la que entra agua y aire a la semilla y sobre este existe un recubrimiento pulposo que proviene del funículo y que se llama arilo. (op.cit)

Las semillas son de color violeta oscuro.(Avilan y Leal., 1989).(fig. 2)

FLOR DEL MARACUYA FIG. 1(a y b)



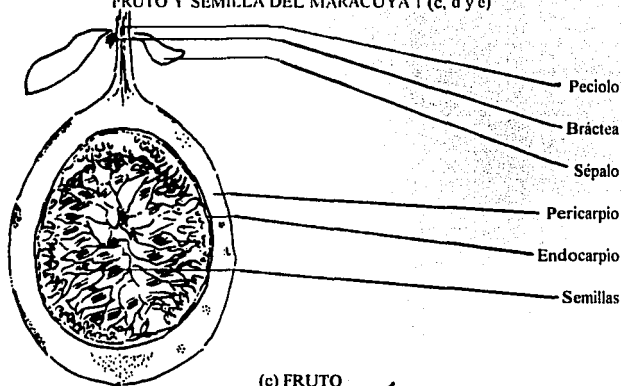
a



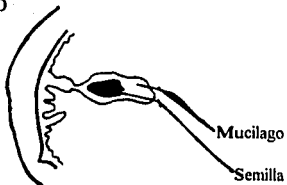
b

Fuente: Leal, P. F. y Grazia, A. M., 1986.

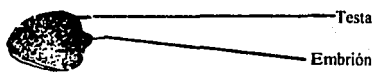
FRUTO Y SEMILLA DEL MARACUYA I (c, d y e)



(c) FRUTO



(d) DISPOSICIÓN DENTRO DEL FRUTO



(e) SEMILLA

Fuente: Leal, P. F. y Grazia, A. M., 1986.

3.4.- CONDICIONES ECOLOGICAS.

El maracuyá puede ser cultivado en altitudes de los 0 a los 1,300 m. s. n. m. con temperaturas entre 23 y 30 °C, humedad relativa baja, condiciones favorables de polinización por los insectos y ausencia de vientos fríos y heladas. El maracuyá es una planta de clima tropical, que exige precipitación anual de 1,500 mm.

Los suelos más indicados para el maracuyá son los arenosos o levemente arcillosos, profundos, bien drenados o con pH superior a 5. Los suelos arenosos son considerados de baja fertilidad razón por la cual deben de ser abonados, especialmente con aplicación de elevadas dosis de materia orgánica.

3.5.- PROPAGACION.

La reproducción sexual, por semilla, es la forma más usada. Se puede utilizar también la multiplicación asexual por estaca, acodo, o injerto, sin embargo por el primer método exclusivamente se obtiene una planta por semilla, y de ahí la gran heterogeneidad presente en huertos establecidos de maracuyá.

3.5.1.- REPRODUCCION SEXUAL.

Se recolectan los frutos a finales del otoño de plantas sanas, vigorosas y las más productivas; dejándolos madurar hasta que se arruguen, para entonces abrirlos y separar la semilla de la pulpa. Una vez extraída la semilla no debe almacenarse por más de seis meses, en un sitio fresco y ventilado.

En promedio cada fruto contiene normalmente 250 semillas. Los pasos a seguir para propagar por semilla son los siguientes:

Germinación.....30 días

Almácigo.....30 días

Sitio definitivo a floración 180 días

Periodo de producción..... 420 días

Se considera un ciclo vegetativo normal de 20 meses; los primeros 6 meses corresponden al desarrollo y formación de la planta. Los otros 14 meses están repartidos en 3 cosechas grandes cada una de 2 meses, intercaladas con pequeñas cosechas de 4 meses cada una. Las cosechas coinciden con periodos secos. (Serna, 1994).

3.5.2.- MULTIPLICACION ASEXUAL.

3.5.2.1.- ESTACADO

-El estacado proporciona un buen vigor y una fructificación más rápida que la semilla, pero esta técnica sólo será realmente interesante cuando se disponga de líneas infértiles. En la espera es necesario escoger como pies madres plantas que no sean autoestériles.

Habiendo tomado esta precaución, se procede a elegir plantas sanas, y se escogen estacas apicales de unos 8 centímetros, en los meses de Abril a Septiembre, inmediatamente después de una fase de crecimiento vegetativo, tratarlos con auxinas y plantarlas en un sustrato muy aireado, con calor de fondo. Reducir el follaje y colocar las estacas bajo nebulización.

El enraizamiento necesita de un mes, después de lo cual las plantas son repicadas en envases individuales en un sustrato más rico.

La plantación podrá hacerse al cabo de 3 meses, sin embargo el enraizamiento es poco constante en esta especie por lo que se tiene que utilizar las plántulas provenientes de semillas. (Zuang, Barret y Beau, 1992).

3.5.2.2.- ACODO.

El acodo (compuesto o seperentario) se efectúa cuando la planta alcanza 1 metro de altura, doblando la rama principal hasta el suelo, quedando alternadamente cubierta y descubierta a lo largo de su extensión. Generalmente la rama se lesiona o anilla en su parte inferior y se cubre con tierra ó medio para enraizado.

En cada una de las secciones enterradas se forman raíces. La parte expuesta de la rama deberá de tener cuando menos una yema para formar un nuevo brote. Una vez que el acodo ha enraizado, la rama se corta en secciones formadas por el nuevo brote y por la porción que lleva las raíces, y se colocan en sustrato más rico.

Esté método de multiplicación se lleva aproximadamente 4 meses, obteniendo una planta por brote acodado.(op. cit.)

3.5.2.3.- INJERTO.

El injerto se utiliza en los suelos infectados de *Fusarium* o de *Thielaviosis*. Los portainjertos deben tener 4 mm de diámetro y al menos 20-25 centímetros de alto, de manera que el punto de injerto no corra peligro de estar en contacto con el suelo. Los injertos de 7 a 10 centímetros comprenden al menos dos yemas.

Se utiliza un injerto de látigo y lengüeta, se corta el injerto y el portainjerto en bisel de 2.5 centímetros de diámetro, ajustar y ligar rápidamente sin recubrir el ojo.

También se puede utilizar el injerto en hendedura con las mismas precauciones. La soldadura es muy rápida. Cuando las plantás tienen 60 centímetros de alto, ponerlas en el terreno definitivo.

3.5.3.- POLINIZACION

La mayoría de las variedades amarillas de maracuyá son autocompatibles, el porcentaje de autofecundación es poco significativo. La transmisión del polen puede realizarse en pequeña escala por el viento, siendo sin embargo la polinización por insectos la más eficiente, por que las flores son grandes, atractivas, con abundante aroma y néctar, y los granos de polen son grandes y pegajosos. De este tipo de polinización depende en gran parte la fructificación.

La polinización está sujeta principalmente a los insectos, la humedad del estigma y la curvatura del estilo. (Serna, 1994)

El maracuyá existen tres tipos de flores, las cuales se diferencian entre sí, solamente por la curvatura del estilo en el momento de la antesis y la cual determina la posición del estigma en relación a la antera (Ruggiero, Lam, Carualho., 1976)

- Flores con estilo totalmente curvos (T.C), en las cuales los estigmas se encuentran debajo de las anteras, posición que facilita ampliamente la polinización cruzada por los insectos. Estas flores ocurren en proporción variable en la planta desde un 70% hasta alcanzar en algunas un 100%.

- Flores con estilo parcialmente curvo (P.C.) en los cuales los estigmas se encuentran encima de las anteras formando con ellas un ángulo de 45° aproximadamente, ocurriendo las mismas en un porcentaje variable del 10% hasta 28%. La distancia entre los estigmas y las anteras dificultan la polinización cruzada.

-Flores sin estilo curvo (S.C.) en las cuales los estigmas están unidos formando un ángulo aproximado de 90° en relación a las anteras. Ocurren en un porcentaje variable de 2% al 13% y no todas las plantas presentan este tipo de flor, que debido a la posición de los estigmas en relación a las anteras dificulta la polinización. La curvatura de los estilos ocurre en un periodo de una hora o de después de la apertura de la flor. (Ruggiero, Lam. Canvalho, 1976) (fig. 3a, b, c)

FIGURA 2 TIPOS DE FLOR



a) Estilo (T. C)

Totalmente Curvo



b) Estilo (S. C.)

Sin curvatura



b) Estilo (P.C.)

Parcialmente Curvo

Fuente: Avilan, R. L., Leal, P. F., y Bautista, A. D., 1989

Son muchos los insectos que visitan las flores, pero los más importantes como polinizadores son:

- La abeja carpintera o abejorro negro (*Xylocopa sp.*)
- La abeja melífera (*Apis mellifera*)
- La avispa negra (*Polistes sp.*)

Las flores de la variedad morada son autofértiles. (Serna, 1994).

3.4.3.- PROPAGACION IN VITRO.

La producción de frutales tropicales y subtropicales se ha incrementado en los últimos años (FAO Production Yearbook, 1987).

A pesar de la eficiencia de los métodos de multiplicación vegetativa, (injerto, acodo y estacado), ya existen algunos cultivos tropicales y subtropicales que sus plantaciones podrían extenderse rápidamente, no obstante se ven impedidas por falta de material clonal, particularmente la liberación de cultivares superiores como el *Averrhoa carambola*.

Entre los menos explotados de los frutos tropicales y subtropicales, cuya producción es importante regionalmente, debido a que la multiplicación vegetativa convencional frecuentemente es ineficiente se encuentra en: *Calocarpum sapota* y *Euphoria longan*, o virtualmente imposible a pesar de cientos años de experiencia *Garcinia mangostana*. Por lo tanto algunos cultivos tropicales y subtropicales no han sido explotados por la falta de plantación de material clonal.

La plantación de nuevos huertos de frutos tropicales y subtropicales multiplicados vegetativamente de algunos clones, se ven severamente reducidos en su producción por el ataque de algunos patógenos, de tal forma que los productores de cítricos han establecido programas de liberación de material clonal que es resistente al virus de la tristeza de los cítricos logrado por medio de un microinjerto de meristemo sobre un portainjerto *in vitro* (Bitters, y cols. 1970). El International Network for Improvement of Bananas and Plantains (INIBAP) ha dado a conocer de manera internacional dos nuevos cultivares micropropagados de plátanos (*Musa* grupo AAA) (Hwang y cols. 1984; Oglesby y Griffiths, 1986) y (*Musa* grupo ABB) resistentes al Sigtoke negra, y que han demostrado ser eficientes por su bajo costo de mantenimiento e incremento de la producción en áreas seriamente afectadas por esta enfermedad. Otra enfermedad de los frutos tropicales y subtropicales que limita seriamente la producción es *Phytophthora cinnamoni*, que provoca la pudrición de la raíz en el Aguacate *Persea americana*, la cual puede ser controlada por un clon resistente a la enfermedad que sirva como patrón, multiplicado *in vitro*.

Pierik (1990). Define el cultivo *in vitro* como: El cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles de plantas, semillas, embriones, órganos, explantos, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores.

El cultivo de tejidos vegetales se basa en la teoría hecha por Schwann y Schleiden en 1838 llamada de la "Totipotencia" la cual establece que las células son autosuficientes y que en principio son capaces de regenerar una planta completa (Gautheret, 1983. Citado por Pierik, 1990).

3.5.4.1.- FASES O ESTADOS DEL CULTIVO IN VITRO.

Murashige(1974), Menciona que en el cultivo *in vitro* se llevan acabo ciertas fases especiales que son:

- Establecimiento del cultivo en un medio aséptico.
- Enraizamiento del propágulo o proliferación
- Enraizamiento y preparación para el trasplante al suelo.

Villegas (citado por Ochoa, 1983). Caracteriza cuatro fases tres *In vitro* y una *In vivo*.

- Establecimiento del cultivo aséptico.
- Multiplicación del propágulo o proliferación.
- Enraizamiento.
- Aclimatación la cual se lleva *in vivo*.

Posteriormente Zimmerman, (1990). Establece cuatro fases pero incluye una fase llamada cero "0", en donde la planta madre o donadora del explanto se encuentra en precondicionamiento, dichas fases son las siguientes:

3.5.4.1.1.- FASE CERO "0".

Esta fase tiene como finalidad prevenir problemas de contaminación.

Manteniendo a la planta madre en un invernadero limpio controlando la temperatura y la humedad relativa para poder reducir ó eliminar los problemas, principalmente de hongos y bacterias, en esta fase los cambios fisiológicos asociados a la planta madre se le incluyen algunas manipulaciones de tal forma que la planta sea apta para reproducirse *in vitro*, estas manipulaciones son luz, temperatura y reguladores de crecimiento.(Zimmerman, 1990).

3.5.4.1.2.- FASE "1" "ESTABLECIMIENTO ASEPTICO"

Tiene como objetivo evitar la contaminación del material vegetal por lo cual debe llevarse a cabo una cuidadosa esterilización.

En principio existen cuatro fuentes de infección: La planta, el medio nutritivo, el aire y la destreza del operador.

Siendo la más importante de estas fuentes de contaminación la planta misma, el material vegetal deberá ser bien esterilizado antes de su aislamiento *in vitro* (Pierik, 1990).

Los principales productos para esterilizar son:

- El alcohol al 70% ya que el alcohol al 96% dañaría los tejidos.
- El hipoclorito de sodio

- El hipoclorito de calcio
- El cloruro mercurico.

La esterilización puede ser más efectiva añadiendo agentes desinfectantes como el "Tween 20 u 80" o con hipoclorito sódico al vacío. (op. cit).

En el cultivo de embriones, generalmente no existen problemas de contaminación, las semillas maduras se encuentran desinfectadas en su exterior, a partir de ellas se obtienen los embriones abriendo la cubierta seminal.

La disección de los embriones presenta mayor número de problemas. Se debe tener cuidado cuando se retira la cubierta de una semilla madura, ya que resulta fácil dañar los embriones. En el caso de semillas con embriones inmaduros, generalmente es más fácil (op.cit).

Theder (1991), citado por Pierik, (1990), aisló embriones de cereza como a continuación se indica:

Primero se retiran los huesos de los frutos, se seleccionan las mejores semillas y se esterilizan las semillas seleccionadas.

A continuación se rompe el endocarpio leñoso, quedando a la vista el embrión, se retiran los embriones con la ayuda de unas pinzas de punta, y se siembran sobre un medio sólido.

En el caso de la cebada se retira el fruto de la espiga, se desinfecta, se aclara con agua estéril y se coloca sobre una caja de petri estéril, con la raquilla hacia abajo y la lema hacia arriba. Después de retirar la lema, el embrión queda libre. Se separa con un escarpelo y se siembra sobre el medio (Large, 1969, en: Pierik, 1990).

En el caso de la azucena, se esteriliza el fruto cerrado, se sacan las semillas y se colocan en agua estéril para impedir su deshidratación. Se retira la cubierta seminal raspando con un escarpelo, haciéndose así visible el endospermo. El embrión puede entonces aislarse a través de unos cortes longitudinales, o es obligado a salir del endospermo a través de un agujero lateral. El embrión se siembra tan pronto queda en libertad (Small, 1980 en: Pierik, 1990).

3.5.4.1.3.- FASE "2" "MULTIPLICACION"

En el clásico estado 2, el cultivo suministra brotes para su subsecuente multiplicación.

En esta fase pueden producirse dos tipos de brotes: Los brotes adventicios y los brotes axilares, los cuales son una respuesta a estímulos de altas concentraciones de citocininas en presencia de menor concentración de auxina, buscando un nivel normal más apropiado para cada caso (Cruz, 1983 y Zimmerman, 1991).

Hay que tomar en cuenta ciertos aspectos que influyen en esta fase, tales como:

- El tipo de brote que se forme
- Número de subcultivos
- Tipo de explanto
- Sistema de propagación
- Medio ambiente

(Zimmerman, 1991).

3.5.4.1.4.- FASE "3" "ENRAIZAMIENTO"

Fundamentalmente esta fase involucra la inducción y diferenciación de raíz en los brotes obtenidos durante la proliferación existiendo así una conversión de un estado heterotrófico a un autótrofo al desarrollo de la radícula (Cruz, 1983). En los cultivos de embriones esto se lleva a cabo hasta que el embrión a germinado.

3.5.4.1.5.- FASE "4" "ACLIMATACION"

Una planta que se haya originado *in vitro*, difiere en muchos aspectos de las que se originan *in vivo*.

Las plantas cultivadas en tubos de ensaye *in vitro* tiene generalmente la cuticula escasamente desarrollada, debido a la alta humedad relativa, y cuando se transfieren al suelo se produce una transpiración cuticular extra.

Las hojas son frecuentemente finas, blandas y fotosintéticamente poco activas y por lo tanto mal adaptadas a las condiciones, tienen las células de empalizada, más pequeñas y en menor cantidad.

Los estomas pueden no ser suficientemente operativos y al permanecer abiertos, cuando la planta sea pasada al suelo puede sufrir un estrés hídrico durante las primeras horas de aclimatación.

La conducción de agua entre vástagos y raíces puede verse reducida por una pobre conexión vascular.

Las raíces que se han originado son vulnerables y no funcionan de forma adecuada *in vivo* (no tienen, o tienen pocos pelos radiculares).

La aclimatación comienza con un preacondicionamiento, disminuyendo la humedad relativa y controlando la temperatura y la luz.

Las plantas deben habituarse a una humedad relativa baja gradualmente.

También se hace preadaptación a los regímenes de luz y temperatura que prevalecen en el invernadero durante el trasplante.

Las plantas al ser transplantadas, se les debe eliminar el agar para evitar infecciones por hongos y bacterias. Deben sumergirse en una solución fungicida e impregnar la raíz con un enraizador comercial, para acelerar la formación de raíces.

El sustrato debe ser esterilizado y tener una buena porosidad, drenaje, aireación y un pH adecuado, y en algunos casos adicionar nutrientes al sustrato.

En los últimos años los sistemas de nebulización se han generalizado para la aclimatación de plantas *in vitro* manteniendo una humedad relativa alta en donde también se incrementa la humedad del sustrato, por lo consiguiente eleva la sobrevivencia de las plantas en esta fase (Pierik, 1990; Rusell y Villalobos 1990; Zimmermann, 1991).

3.6.- RESCATE DE EMBRIONES.

El embrión representa el comienzo de una nueva generación esporofítica de la planta. En las plantas criptogámas, el embrión tiene su origen en el cigoto, el cual es generalmente localizado en el gametofito femenino.

El cultivo de embriones consiste en el aislamiento y crecimiento *in vitro* en condiciones estériles de un embrión inmaduro, con el fin de obtener una planta viable (Pierik, 1990).

El primer cultivo de embriones fue obtenido a partir de embriones maduros extirpados de semillas de *Raphanus* y *Cochlearia* (Hanning, 1904), y no de embriones inmaduros aislados de óvulos.

La razón para que esto ocurriera es explicable, ya que con pocas excepciones, el embrión que se encuentra en las semillas está totalmente desarrollado en una estructura bipolar, la cual contiene un meristemo en cada polo y además los cotiledones. Por consiguiente al momento de cultivar el embrión, este contiene células que potencialmente están preparadas para efectuar la división, alargamiento y diferenciación, permitiendo el desarrollo progresivo de la raíz y los brotes axilares de la plántula.

De esta manera, los requerimientos nutricionales para este tipo de embriones son mínimos.

Así, el tamaño relativamente grande de estos embriones, y la facilidad con que puedan aislarse han contribuido en gran parte a utilizarlos en los primeros estudios desarrollados en este campo (López, P. C. 1990 en: Rosell y Villalobos, 1990).

Pierik (1990) hace una distinción de dos tipos de cultivo de embriones:

3.6.1.- CULTIVO DE EMBRIONES INMADUROS: Se originan de semillas no terminadas de madurar. Este tipo de cultivo se emplea sobre todo para impedir el aborto embrionario (muerte prematura del embrión) con el fin de obtener una plántula viable. Este tipo de cultivo es extremadamente difícil, en parte porque se necesita un medio de cultivo complejo. Las posibilidades de éxito de este tipo de cultivo, dependen mucho del estado de desarrollo del embrión en el momento de ser aislado.

3.6.2.- CULTIVO DE EMBRIONES MADUROS: Se encuentran en semillas maduras. Este cultivo es relativamente fácil y se utiliza por ejemplo, para eliminar la inhibición (absoluta) de germinación de las semillas. Suele ser suficiente en estos casos el uso de un medio simple con agar, azúcar y minerales.

El modelo de crecimiento del embrión difiere de una planta a otra, pero pueden hacerse ciertas generalizaciones. La división celular inicial del cigote forma dos células, una de las cuales formará al embrión y la otra al suspensor. El suspensor sirve para mantener el anclaje u orientación del embrión y para que se introduzca en la masa del endospermo del que deriva su nutrición. (Bidwell, 1979).

El embrión pasa a través de los siguientes estadios: estadio globoso, estadio de corazón, estadio de torpedo y estadio cotiledonar llamados así por su apariencia.

- **ESTADIO GLOBULAR:** Las divisiones celulares están orientadas específicamente a la formación del embrión y el suspensor. El embrión en este momento es un cuerpo relativamente masivo, mientras que el suspensor tiene la forma de un pedúnculo, de longitud variable uniseriado o masivo y esta unido a la pared del saco embrionario en el extremo micropilar.

- **ESTADIO DE CORAZON:** Subsecuentemente el embrión adquiere una forma bilobada, debido a la apariencia de dos cotiledones. Los cotiledones del embrión se originan como dos protuberancias meristemáticas sobre el extremo apical del embrión, la emergencia de los cotiledones va precedida de una expansión lateral de el extremo apical del embrión.

- **ESTADIO DE TORPEDO:** La iniciación de los cotiledones hace que la simetría del embrión pase de radial a bilateral. La expansión del extremo apical del embrión como preparación para la emergencia de los cotiledones es comparable a la formación de las bases foliares en los vértices vegetativos.

- ESTADIO COTILEDONAR: El embrión ya ha desarrollado una radícula o meristemo radical y un meristemo del tallo.

Si se compara el desarrollo de embriones inmaduros *in vitro* e *in vivo*, y si partimos del estado globoso, los embriones *in vitro* generalmente tienen:

- Un incremento globoso en forma de pera.
- Una expresión morfo genética retardada : Estado globular más largo.
- Inicialmente un sólo cotiledón (en cotiledóneas) mientras que en *in vivo* se desarrollan los dos en forma simultánea
- Posibilidad de exhibir un desarrollo policotiledonar (más de dos cotiledones), lo cual rara vez sucede *in vivo*

Los embriones aislados *in vitro* generalmente muestran una germinación precoz (Jensen, 1979 en: Pierik, 1990).

Ya que se produce una pérdida de inhibidores al retirar la cubierta seminal; la otra razón podría ser el que el potencial osmótico negativo que existe *in vivo*, tenga un valor mucho más alto *in vitro* (Pierik, 1990).

El desarrollo de los embriones vegetales se caracteriza por dos estados distintos: el estado temprano, que es heterotrófico, y el tardío, que es autotrófico. Los embriones globulares heterotróficos se desarrollan a expensas del endospermo y poseen una baja capacidad de síntesis; el desarrollo de los embriones en estado de "corazón" depende de ciertos nutrimentos como hormonas, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, purinas y pirimidinas que se encuentran en el saco embrionario.

Con la formación de los cotiledones, el embrión pasa a ser autótrofo y se puede aislar de los óvulos y cultivarse *in vitro* en un medio relativamente simple, que contenga pequeñas cantidades de unos pocos nutrimentos.

3.6.3.- USOS DEL RESCATE DE EMBRIONES IN VITRO.

El cultivo de embriones se ha usado para diferentes propósitos, como los de estudiar los requerimientos nutricionales de embriones en desarrollo, rescatar embriones híbridos que se hayan derivados de cruzamientos interespecíficos e intergenéricos, producir monoploides y superar la latencia de las semillas. Igualmente, el cultivo de óvulos intactos se ha empleado para el rescate de embriones (mediante la polinización y fertilización *in vitro*) y para inducir embriogénesis somática a partir de nucelas de algunas especies de plantas. En algunos artículos recientes se han hecho revisiones de estas áreas.

Las aplicaciones prácticas más importantes del cultivo de embriones se indican a continuación:

- Eliminación de la inhibición (absoluta) de germinación de las semillas. En algunas especies es absolutamente imposible lograr la germinación *in vivo* siendo imprescindible en estos casos del cultivo de embriones (Bulard y Dégivry, 1965).

- Germinación de parásitos obligados, que resulta imposible *in vivo* sin la presencia del huésped, pero que puede conseguirse con el cultivo de embriones (Raghavan, 1980).

- Acortar el ciclo de mejora; existen muchas especies que presentan dormición seminal, la cual frecuentemente se localizan en la cubierta de la semilla y/o endospermo.

Aislado los embriones se puede producir una germinación inmediata (Randolph y Cox, 1943; y Rabenchauld et, al. 1969).

A veces la germinación se ve atrasada, más no impedida del todo, por la impermeabilidad de la cubierta al agua y al oxígeno. En estos casos el cultivo de embriones puede acelerar la germinación.

Hay que tener en cuenta que el cultivo de embriones inmaduros puede producir un acortamiento mayor del ciclo de mejora.

- Producción de haploides: En el cruce de *Hordeum vulgare* X *Hordeum bulbosum*, se produce la fertilización pero después los cromosomas de *H. bulbosum*, son eliminados, produciéndose como resultado un embrión haploide de *H. vulgare*, el cual es solo viable por el cultivo de embriones. Si se duplican los cromosomas, al final se produce un homocigoto de *H. vulgare* (Kasha y Kao, 1970).

- Prevención de aborto embrionario en frutales de hueso precoces.

El transporte de agua y nutrientes al embrión todavía inmaduro, en cruces con frutales de hueso precoces (melocotón, cerezo, albaricoque, ciruelo), queda cortado a veces demasiado temprano, produciéndose el aborto del embrión, en la práctica esto quiere decir que no son posibles los cruces con una madre precoz, la única solución, es utilizar el cultivo de embriones, para evitar el aborto *in vivo*.

- Prevención del aborto embrionario como resultado de incompatibilidad:

En el caso de cruces interespecíficos, intergenéricos, y en el caso de cruces por ejemplo de diploides, o tetraploides, el endospermo puede no desarrollarse o hacerlo muy pobremente. el resultado es el aborto embrionario *in vivo*, que puede ser evitado exclusivamente por el cultivo de embriones.

- El cultivo de embriones, se utiliza frecuentemente en cruces interespecíficos.
- El cultivo de embriones se emplea también en las cruces entre diploides y tetraploides (que producen triploides).

- Propagación vegetativa: Los embriones se utilizan como un material inicial para la propagación vegetativa. Por ejemplo: en las gramíneas y coníferas, los embriones responden muy bien debido a que se trata de un material juvenil (Pierik, 1990).

Una de las aplicaciones del cultivo de embriones es el rescate de material de propagación en los frutales deciduos cuyas semillas son generalmente de baja viabilidad, también ha ayudado al mejoramiento genético de especies arbóreas por que acorta el periodo siembra-floración; los embriones cultivados *in vitro* no necesitan un periodo de

latencia anterior a la germinación. Asimismo, ha sido efectivo para acortar el ciclo de mejoramiento de *iris spp.*, porque acorta el periodo de latencia de las semillas que oscila entre unos pocos meses y varios años; esta latencia se debe a algunos inhibidores del crecimiento del embrión presentes en el endospermo (Randolph y cols. 1943) y en la cubierta de la semilla (Lenz, 1955). Por medio del cultivo de embriones, es posible acortar la latencia y producir plántulas para el trasplante a las 2 ó 3 semanas.

En un estudio se obtuvo un gran desarrollo de plantas de papa comparado con el procedimiento de germinación convencional. En uno de los casos la germinación se incremento de un 12.5% de un total de 46 días de germinación a un 88.6% de embriones en 6 días de incubación. (Anónimo, 1982)

Maranta leuconeura, una importante planta tropical de follaje ornamental, que normalmente se propaga asexualmente por estacas, también se pueda reproducir por semilla aunque raramente germinen. Usando la técnica de cultivo de "rescate de embriones", Henny (1980) obtuvo 65% de germinación el cual se incremento al 100%.

3.7.- MEDIO DE CULTIVO

El crecimiento del embrión está determinado por la composición del medio de cultivo y por el manejo del embrión (Raghavan, 1977; Monnier, 1928; Bhojwaan y Razdan, 1983 en: Gonzáles, M. A., 1991), donde destacan dos estados nutricionales: Un primer estado heterotrófico que se presenta durante las primeras etapas del desarrollo del embrión; el cual se nutre básicamente del endospermo y tejidos adyacentes cuando los hay, y un segundo estado nutricional autotrófico, durante el cual el embrión sintetiza metabólicamente las substancias

requeridas para su crecimiento a partir de las sales minerales y azúcares (Raghavan, 1966), estados que pueden variar con el genotipo (op. cit.) y la inclusión del embrión en el óvulo (Yeung et al. 1981; Bhojawani y Razdan 1983), los cuáles han sido estudiados ampliamente en *Capsella* y *Ordeum* (Raghavan, 1977 y Bhojwani y Razdan, 1983).

El medio de cultivo es una solución acuosa que está constituida por sales orgánicas, vitaminas, aminoácidos, carbohidratos, agua, agentes gelificantes y reguladores de crecimiento.

3.7.1.- SALES INORGANICAS

Las sales inorgánicas o minerales se dividen en dos grupos que son los macronutrientes y micronutrientes .

3.7.1.1.- MACRONUTRIENTES.

Los tejidos en cultivo requieren de una fuerte cantidad de compuestos inorgánicos.

Además de carbono, hidrógeno y oxígeno, los elementos más requeridos son principalmente nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre.

Nitrógeno: Este influye en el índice de crecimiento de planta, es un elemento esencial en la composición molecular de la clorofila, alcaloides, ácidos nucleicos, aminoácidos y algunas hormonas plantas (Kyte, 1987).

El medio de cultivo empleado para el cultivo de embriones es suplementado principalmente con nitrógeno inorgánico, en la forma de nitrato, nitrito o amonio, la adición de varios aminoácidos en forma individual o combinados (Raghavan, 1978).

En general, se ha encontrado que también la glutamina es la fuente de nitrógeno más eficiente para el crecimiento de embriones en un gran número de especies. Estudios sobre la nutrición con nitrógeno

han sido muy útiles para evaluar el alcance entre el cinergismo y antagonismo entre diferentes aminoácidos. (Peralta, L. en: Rosell y Villalobos, 1990).

- Fósforo.-** Este elemento es abundante en el meristemo y otros tejidos de rápido crecimiento. Su principal utilidad aparece como activador de enzimas (las enzimas son compuestos que promueven reacciones sin ser parte de ellas). Las fuentes de fósforo utilizadas in vitro son: fosfato de potasio ($K_2 H_2 PO_4$) y fosfato de sodio ($Na H_2 PO_4 H_2O$) (Kyte, 1987).
- Potasio.-** Es necesario para la división celular, para la síntesis de carbohidratos y proteínas, para la elaboración de clorofila y la reducción de nitratos. Las fuentes principales son: el nitrato de potasio (KNO_3) y el fosfato de potasio (KH_2PO_4), y ocasionalmente se utiliza el cloruro de potasio (KCl) (Kyte, 1987).
- Calcio.-** Como pentato de calcio, es parte integral de las paredes celulares y juega un rol en la permeabilidad; facilita el movimiento de carbohidratos y aminoácidos por toda la planta y promueve el desarrollo de la raíz. En el cultivo in vitro se utiliza como cloruro de calcio ($CaCl_2 H_2O$), nitrato de calcio ($Ca (NO_3)_2 4H_2O$).

Magnesio.- Es el elemento central en las moléculas de clorofila. Es también un importante activador de enzimas. Las formas más usadas en el medio de cultivo son: Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), también conocidas como sales de epton (Kyte, 1987).

Azufre.- Está presente en algunas moléculas de proteínas. Promueve el crecimiento radicular y el color de el follaje. Es suministrado en forma de sulfatos (SO_4). (Kyte, 1987).

3.7.1.2.- MICROELEMENTOS.

Para una adecuada actividad metabólica, las células vegetales requieren de micronutrientes. Los más esenciales son Fe, Mn, Zn, Bo, Cu, Co y Me. Los últimos 5 elementos son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos (López, P., 1990, en: Rosell y Villalobos, 1990).

Fierro.- Está involucrado en la síntesis de clorofila y participa en la inversión de energía en la fotosíntesis y la respiración, así como en la reducción de estado férrico a ferroso. Es empleado en el medio en forma de sulfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), (Kyte, 1987).

Manganeso.- Es esencial en la membrana de los cloroplastos y en el proceso fotosintético. El sulfato de manganeso ($Mn SO_4 \cdot H_2O$) suministra lo necesario en el medio (Rosell y Villalobos, 1990).

- Zinc.-** Es un elemento vital en las enzimas, toma parte en la formación de clorofila y está relacionado con la síntesis de el triptótano precursor de el (Acido indoloacético).
- Boro.-** Es importante en el crecimiento de el azúcar y es necesario para el mantenimiento de la actividad meristématica, además de que está involucrado en la síntesis de bases nitrogenadas (op. cit.).
- Cobre.-** Es necesario en la conversión de energía como alternante entre el estado cuproso y el cúprico. Es utilizado en el medio como sulfato de cobre ($SO_4 Cu_5 H_2O$), (Kyte, 1987).
- Cobalto.-** Forma parte de la molécula de la compleja raiz, y es necesario para la fijación de Nitrógeno. Se utiliza en el medio en forma de Cloruro de Cobalto ($ClCo 6H_2O$), (op. cit.).
- Molibdeno.-** Participa en la conversión de nitrógeno a amonio, y también en la fijación de el nitrógeno, es adicionado al medio en forma de Molibdanato de Sodio ($Na_2MoO_4 \cdot H_2O$), (Kyte, 1987).
- Cloro.-** Ayuda a estimular la fotosíntesis, aunque su función no esta bien definida, es adicionado en forma de Cloruro de Calcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), (op. cit.).
- Yodo.-** No es considerado un elemento esencial, pero forma parte de algunos aminoácidos, es suministrado al medio en forma de Yoduro de Potasio (KI), (op. cit.).

3.7.2.- AGENTES QUELATOS:

Son compuestos cuyas moléculas, son capaces de detener un ion de un metal con varias uniones químicas, formando un amplio complejo (un quelato). Ejemplo, el EDTA (Acido etilendinitrotetra acético).

Bajas concentraciones de EDTA estimulan el crecimiento, haciendo que el fierro esté disponible en bajas cantidades.

3.7.3.- VITAMINAS.

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades. Las vitaminas más empleadas son:

Tiamina (Vitamina B), Acido Nacotínico (niacina), Pirodoxina (Vitamina V₆), Mínositol; Ac. pantoténico, Ac fólico, Riboflavina, Vitamina B (Rosell y Villalobos, 1990).

Al igual que la importancia de las vitaminas en la nutrición de plantas, éstas presentan un papel relevante en un sistema de cultivo in vitro para el crecimiento de los embriones.

Algunos de los elementos proporcionados por las vitaminas han sido: la tiamina y el ácido ascórbico, los cuales promueven el alargamiento en el cultivo de embriones de varias especies, sin embargo, la biotina, el ácido pantoténico y la niacina, han inducido el crecimiento de brotes (Norslog, 1973).

3.7.4.-AMINOACIDOS.

Ningún aminoácido es esencial para el crecimiento de tejidos in vitro, sin embargo, existen varios que se han utilizado experimentalmente. Los aminoácidos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno al tejido y su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio. También pueden actuar como agentes quelantes (Rosell y Villalobos, 1990) y según Kyte (1987), pueden llegar a formar bloques de proteínas y aminoácidos (op. cit.).

3.7.5.- CARBOHIDRATOS.

Son utilizados como fuente de energía y como reguladores osmóticos. La sacarosa es el azúcar empleado universalmente, y le sigue en importancia la glucosa, maltosa, ratinosa, fructuosa y galactosa, manosa y lactosa (Rosell y Villalobos, 1990).

Se ha determinado que el crecimiento y la supervivencia del cultivo de embriones es incrementado marcadamente por la suplementación de una fuente de carbono al medio de cultivo.

La superioridad de la sacarosa en este papel central ha sido establecida para algunas especies.

3.7.6.- ANTIOXIDANTES.

Se emplean para reducir la oxidación en los tejidos y entre estos se encuentran: el ácido cítrico, ácido ascórbico y carbón activado (Kyte, 1987).

Sin embargo en algunos embriones pertenecientes a la familia Rosáceas, la glucosa ha igualado y a veces superado a la sacarosa. También se ha encontrado que los carbohidratos promueven el crecimiento de las raíces (Pietsema, 1953 y Hamna, 1955).

3.7.7.- AGUA.

El agua es uno de los componentes más importantes, ya que constituye el 95% del medio de cultivo (Pyerik, 1990). Esta debe ser destilada, tridestilada o desmineralizada. (Rosell y Villalobos, 1990).

Para almacenarla, se recomienda utilizar los mejores recipientes, los cuales son los elaborados a base de polietileno, ya que el vidrio contiene minerales.

3.7.8.- AGENTES GELIFICANTES.

Comúnmente se han empleado, al igual que el sistema de "soporte" para la preparación de medios sólidos o semisólidos.

Las ventajas que presenta el agar son:

- Forma sales que se derriten a 100°C y se solidifican a 45°C, lo cual quiere decir que es estable a todas las temperaturas de incubación.

- No es alterado por las enzimas vegetales
- No reacciona con los constituyentes del medio
- No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio.

Otros compuestos se han empleado para sustituir el agar, sin embargo pocos han tenido éxito. Debido a que el agar es costoso, es importante tomar en cuenta otros compuestos que permita sustituir este soporte (Rosell y Villalobos, 1990).

3.7.9.- REGULADORES DE CRECIMIENTO.

En el cultivo de tejidos se utilizan propiamente cuatro grupos:

Auxinas.- Ayudan a la elongación celular, y los más utilizados son:

AIB (Acido indolbutirico),
AIA (Acido Indoloacético),
ANA (Acido Naftalenacético),
2,4-D (Acido 2,-4 Diclórufenoxiacético) y
DCA (Acido Paraclórufenoxiacético).

Citocininas.- Promueven la división celular y organización de callos, los más utilizados son: BA(Benciladenina); cinetina y zeatina.

Acido Giberélico.- Promueve la elongación y reprime la formación de brotes de cualquier clase de tejido organizado.

Acido Abscísico.- Se utiliza en casos muy especiales, estimula la sincronización durante la embriogénesis en ciertos cultivos; también inhibe el crecimiento.
(Rosell y Villalobos, 1990).

Los reguladores de crecimiento en el cultivo de embriones, no ha demostrado tener un efecto significativo, excepto en aquellos casos donde se requieren para romper la latencia en algunas especies (Hu y Wang, 1980), la cual puede establecer una estrecha interacción en el ambiente, nivel hormonal endógeno y características físicas de la semilla (Bidwell, 1979), las cuales interactúan en la germinación de las semillas, donde las giberelinas presentan un efecto primario, el cual se inhibe en ausencia de citocininas como función preventiva, induciendo al letargo en presencia o no de un inhibidor con efecto permisivo (Khan, 1975), proceso que es regulado por el fitocromo en presencia de luz roja (Bidwell, 1979).

3.7.9.- REGULADORES DE CRECIMIENTO.

En el cultivo de tejidos se utilizan propiamente cuatro grupos:

Auxinas.- Ayudan a la elongación celular, y los más utilizados son:

AIB (Acido indolbutírico),
AIA (Acido Indoloacético),
ANA (Acido Naftalenacético),
2,4-D (Acido 2,-4 Diclorofenoxiacético) y
DCA (Acido Paraclorofenoxiacético).

Citocininas.- Promueven la división celular y organización de callos, los más utilizados son: BA(Benciladenina); cinetina y zeatina.

Acido Giberélico.- Promueve la elongación y reprime la formación de brotes de cualquier clase de tejido organizado.

Acido Abscísico.- Se utiliza en casos muy especiales, estimula la sincronización durante la embriogénesis en ciertos cultivos; también inhibe el crecimiento.
(Rosell y Villalobos, 1990).

Los reguladores de crecimiento en el cultivo de embriones, no ha demostrado tener un efecto significativo, excepto en aquellos casos donde se requieren para romper la latencia en algunas especies (Hu y Wang, 1980), la cual puede establecer una estrecha interacción en el ambiente, nivel hormonal endógeno y características físicas de la semilla (Bidwell, 1979), las cuales interactúan en la germinación de las semillas, donde las giberelinas presentan un efecto primario, el cual se inhibe en ausencia de citocininas como función preventiva, induciendo al letargo en presencia o no de un inhibidor con efecto permisivo (Khan, 1975), proceso que es regulado por el fitocromo en presencia de luz roja (Bidwell, 1979).

3.7.10.- REGULADORES DE CRECIMIENTO EN EL CULTIVO DE EMBRIONES *IN VITRO*

El papel exógeno de los reguladores de crecimiento (auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico), durante el crecimiento de los embriones, inducen modificaciones en el crecimiento y morfogénesis de raíces.

La primera evidencia escrita acerca del empleo de los reguladores de crecimiento en cultivo *in vitro*, fué en 1963, por la Rue, donde se indica que el ácido indolacético (AIA), promovió el desarrollo de embriones de varias especies, incluyendo *Zea Mays*.

Años más tarde, se determinó que el AIA combinado con la cinetina, eran indispensables para el desarrollo de embriones globulares de *Capsella*.

Aunque las auxinas junto con las citocininas, están presentes en el endospermo líquido, que es el ambiente natural durante el desarrollo del embrión, se ha encontrado que mantienen la diferenciación globular de embriones (Raghavan y Torrey, 1963).

La aplicación de auxinas exógenas no es un requisito para el crecimiento de plantas *in vitro* (Vee n, 1963).

Estas observaciones han ayudado en el estudio de embriones somáticos en cultivo de tejidos, ya que en este caso también inhiben el desarrollo a concentraciones altas (Steward, 1970).

El ácido giberélico, induce la germinación precoz en cultivo de embriones de frijol (Skene, 1969), y de cebada (Schooler, 1960; Norstog, 1972). A concentraciones bajas puede promover la embriogénesis sin la germinación prematura de las semillas.

Se ha observado que las citocininas pueden promover el crecimiento de embriones jóvenes de *Capsella* (Ven, 1963), y además cuando se combina con AIA, estimula el crecimiento y diferenciación de embriones, también en combinación con adenina y AIA (Raghavan y Torrey, 1963). La cinetina por su parte puede inducir la formación de embriones adventicios en cultivo de embriones de cebada.

Se ha sugerido que existe una interacción entre giberelinas, citocininas y ácido abscísico (ABA) en el control de la germinación de cebada (Khan, 1975), y una interacción similar de estos tres reguladores parece controlar la germinación en lechuga (Paggi-Pellegrini y Bulard, 1976).

La manera en que interactúan en la germinación de la cebada, es que las giberelinas promueven la germinación, el ABA actúa como un antagonista del ácido giberélico (GA₃), y las citocininas ayudan a liberar las giberelinas del antagonismo del ABA (Khan, 1975 y Norstog, 1972). Tanto el GA₃, el ABA y las citocininas promueven la germinación precoz.

Probablemente el papel del ABA, en el desarrollo normal de embriones, es inhibir la fase de la germinación y crecimiento, y al mismo tiempo permitir la embriogénesis (Rosell y Villalobos, 1990).

3.8.- GERMINACION.

Jann y Amen (1977), indican que morfológicamente, la germinación es la transformación de embrión en plántula, fisiológicamente la germinación es la reanudación del metabolismo y del crecimiento que fué anteriormente reprimido o suspendido.

La germinación es el proceso, mediante el que un embrión adquiere el metabolismo necesario para reiniciar el crecimiento y transmitir las porciones del programa genético que lo convertirán en una planta adulta (Jann y Amen, 1979).

Hartmann y Kestes (1971), mencionan que para que se lleve a cabo el proceso de germinación, se necesita de las siguientes condiciones:

- a) Semilla viable, es decir, que tenga un embrión vivo capaz de crecer.
- b) Temperatura, aireación y humedad adecuada para el proceso.
- c) Eliminación de los bloqueos fisiológicos presentes en las semillas, los cuales podrían impedir la germinación.

Por lo tanto, la germinación es la capacidad del embrión para reanudar las actividades de crecimiento que fueron suspendidas con anterioridad. Es conveniente distinguir entre dos formas de suspensión del crecimiento por el embrión:

La suspensión impuesta por condiciones ambientales, que se designa como quiescencia y la suspensión del crecimiento por inhibición endógena activa, que se llama latencia.

Una semilla quiescente germina rápidamente con suficiente humedad y temperatura favorable. Una semilla latente, sin embargo no germina aun bajo condiciones favorables, y requiere un estímulo específico que no es constante, pero que inicia la germinación.

3. 9. - DORMICION.

Se entiende, como aquel estado en que se encuentra una semilla viable sin que germine, aunque disponga de cierta, humedad para embeberse, una aireación similar a la de las primeras capas de un suelo bien ventilado, y una temperatura que se encuentra entre 10°C y 30°C.

Por lo tanto, quiescencia se entenderá como la inhibición, por no tener las condiciones ambientales adecuadas para la germinación.

Dormición es sinónimo de : Dormancia, letargo, latencia, reposo y vida latente.

Copeland (1976), Hartmann y Kester (1971), Kann (1975), Maguire (1962), Nikolaeva (1969) y (1978). Taylarson y Hendricks (1977). Mencionan que los mecanismos causantes de la dormición son:

- a) Impermeabilidad al agua.
- b) Baja permeabilidad a los gases.
- c) Resistencia mecánica al crecimiento del embrión
- d) Permeabilidad selectiva a los reguladores del crecimiento
- e) Bloqueos metabólicos.

- f) Presencia de inhibidores
- g) Embriones rudimentarios
- h) Adquisición de mecanismos inhibidores

Por otra parte; (Copeland (1976), Crocker citado en Nikolaeva (1978), y Villesse (1972).) sugieren que existe un tipo de dormición cuyo origen se debe a embriones con bloqueos metabólicos, y otro a la baja permeabilidad de las cubiertas a los gases.

De acuerdo con Nikolaeva (1978), y Roberts y Smith (1977), lo anterior es incorrecto pues se encuentran estudios que indican que ambos mecanismos actúan siempre juntos y que las semillas aludidas germinan después de permanecer bajo enfriamiento en húmedo.

Con fundamento en lo anterior, no conviene agrupar a las semillas con cubiertas poco permeables a los gases, junto a las que cuentan con cubiertas impermeables al agua. Tampoco conviene reunir semillas, con cubiertas impermeables al agua junto a semillas con cubiertas gruesas y leñosas. Dado lo anterior, las exigencias para germinar no son las mismas que cuando las cubiertas son impermeables. (Nikolaeva, 1969 y Rolston, 1978).

Copeland (1976) y Niembro (1979) han clasificado a las semillas que contienen inhibidores en un solo grupo, pero debido a que estas sustancias pueden estar presentes en todas las partes de la semilla, o restringirse a las cubiertas, tejidos nutritivos y al embrión, las exigencias que tienen para germinar varían notablemente. Cuando se les encuentra únicamente en las cubiertas, expuestas al ambiente, su eliminación será por medio de agentes externos, como por ejemplo la lixiviación o la pérdida de las cubiertas. En cambio, los inhibidores que se localizan en tejidos internos como son los nutritivos y el embrión, el agua no podrá lixiviarlos debido a la impermeabilidad selectiva de las cubiertas a los reguladores de crecimiento.

Todo esto se encuentra asociado tanto a las cubiertas poco permeables a los gases, como al bloqueo de procesos metabólicos en el embrión (Khan, 1975. Nikolaeva, 1978).

Otra diferencia importante es que cuando los inhibidores se localizan en el interior de la semilla, su eliminación no es directa por acción de un agente externo, sino por que éste

favorece procesos metabólicos que anulan el efecto de los inhibidores.(Khan, 1975. Nikolaeva, 1969, 1978).

Con base a lo anterior se presenta la clasificación de tipos de dormición de Nikolaeva (1978) que se presenta en el cuadro No. 2 .

**CADRO No. 2 CLASIFICACION DE TIPOS DE DORMICION PROPUESTA
POR NIKOLAEVA (1978)**

Tipos de dormición exógena, en que la inhibición reside en las cubiertas expuestas directamente al ambiente.

Tipos de Dormición	Causas
Dormición Física	Impermeabilidad de la testa al agua
Dormición Química	Presencia de inhibidores en la cubierta externa
Dormición Mecánica	Resistencia de las cubiertas al crecimiento del embrión

Tipos de dormición endógena, en que la inhibición reside en el embrión, y/o en las cubiertas que están en contacto con el y están protegidas del ambiente.

Tipo de dormición	Causas
Dormición Morfológica	Presencia de embriones rudimentarios
Dormición Fisiológica	Bloqueos metabólicos y baja permeabilidad de la cubierta a los gases, hay diferencias en su profundidad, por lo que se divide en subtipos.
Fisiológica leve	
Fisiológica intermedia	
Fisiológica profunda	

CONTINUACION...

Tipo de dormición	Causas
Morfofisiológica	Embriones rudimentarios y dormancia fisiológica que afecta tanto la germinación, como el crecimiento de las plántulas.
-Morfofisiológica intermedia	
-Morfofisiológica profunda	
-Morfofisiológica profunda	
epicotilar	Idem, con inhibición del crecimiento del tallo
-Morfofisiológica profunda	
doble	Idem, con inhibición del crecimiento del tallo y la raíz
-Morfofisiológica intermedia	
compleja	Embrión rudimentario que requiere frío para crecer
-Morfofisiológica profunda	
compleja	Idem

Fuente: Camacho, M. F. 1994.

IV.- MATERIALES Y METODOS

4.1.- UBICACION DEL EXPERIMENTO.

El presente experimento se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos, de la Carrera de Ingeniero Agrícola, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

En el experimento se utilizaron semillas de Maracuyá, (*Passiflora edulis. var. flavicarpa.D.*), obtenidas en Teziutlán Puebla y semillas de trigo (*Triticum aestivum L.*) cv Lerma Rojo.

4.2.- ESTABLECIMIENTO.

El experimento se dividió en tres partes:

- Primera parte, Experimento Previo: El cual surge de la necesidad de acortar el ciclo de producción del Maracuyá Maracuyá, (*Passiflora edulis. var. flavicarpa.D.*), eliminando las diferentes estructuras y observar hasta que estructura de tenía que escarificar para poder obtener plantas en menor tiempo.
- En la segunda parte se llevo acabo un Bioensayo de la inhibición del coléoptilo de trigo (*Triticum aestivum L.*) cv Lerma Rojo; propuesto por:: Larque, S. A. y Rodriguez, G. T. Para la cuantificación de el ácido abscísico (ABA), modificado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la F. E. S. Cuautitlán para determinar la presencia de inhibidores en las diferentes estructuras de la semilla de Maracuyá.
- La tercera consistió en el experimento definitivo, en el cual ya una vez determinada las estructuras con mayor contenido de inhibidores son eliminadas, y así se lleva acabo el rescate de embriones in vitro en el cual se evaluó: porcentaje de contaminación, de germinación y días a la germinación.

Las tres partes serán descritas a continuación:

4.3.- EXPERIMENTO PREVIO.

En este experimento se evaluó el tiempo de la germinación de las diferentes estructuras de la semilla de Maracuyá, (*Passiflora edulis*, var. *flavicarpa*.D.), *in vitro* sobre medio de cultivo de Murashige y Skoog al 50 % de su concentración de sales, sin reguladores de crecimiento, los tratamientos fueron los siguientes: semilla completa, saco embrionario con embrión y embrión, el arreglo fue con un diseño completamente al azar, con 10 repeticiones por tratamiento, dando un total de 30 unidades experimentales.

En este experimento no existió contaminación, la germinación duro 28 días para el tratamiento de semilla completa, de 14 a 16 días para el tratamiento de saco embrionario con embrión y de 6 a 7 días para el tratamiento de embrión; como se puede ver en el cuadro 3 y la (Gráfica 1)

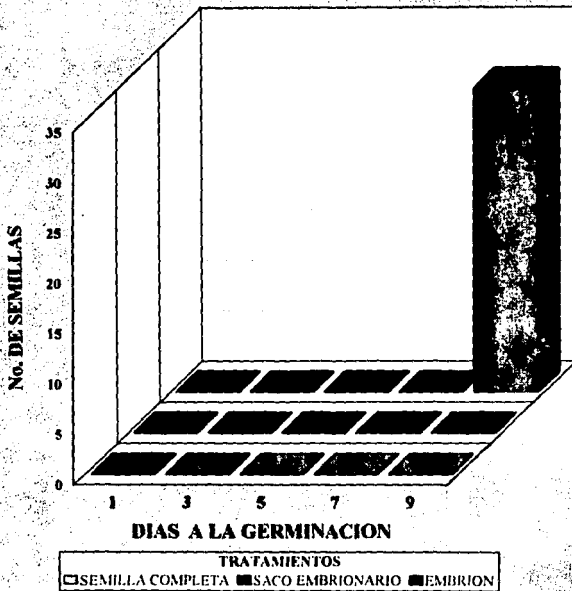
CUADRO 3 TRATAMIENTOS DE EL EXPERIMENTO PREVIO

No.	TRATAMIENTO	DIAS A GERMINACION
1	Semilla Completa	28 DIAS
2	Saco Embrionario	14 A 16 DIAS
3	Embrión	6 A 7 DIAS

De los resultados obtenidos en este experimento se derivó la inquietud de llevar acabo el bioensayo de inhibición del coléoptilo de Semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) cv Lerma Rojo. Para determinar de manera cualitativa, en que estructura de la semilla de maracuyá, (*Passiflora edulis*, var. *flavicarpa*.D.), se encuentra la mayor concentración de inhibidores, la cual es la causante de la dormancia en las semillas de maracuyá.

GRAFICA 1

INDICE DE GERMINACION DE LAS DIFERENTES ESTRUCTURAS DE LA SEMILLA DE MARACUYA



4.4.- DESARROLLO DEL BIOENSAYO.

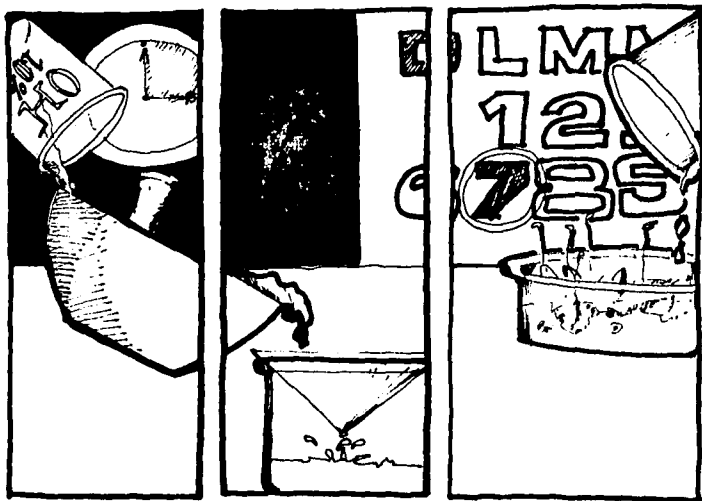
Se pusieron a imbibir las semillas de trigo (*Triticum aestivum*) cv. Lerma Rojo durante seis horas en agua destilada, una vez transcurrido este tiempo, se pusieron a germinar en cajas de petri a las que previamente se les coloco un soporte de papel filtro Whatman del número 1, humedecidos con 6 ml de agua destilada. Se sembraron 30 semillas por caja, todas con la misma orientación (con el embrión hacia abajo), se colocaron en el cámara de cultivo a una temperatura promedio de 30°C y en total oscuridad. Se regaron con 6 ml de agua destilada en los 3 días siguientes al establecimiento, al tercer día se separaron los coléoptilos con 3 cms de longitud, colocándose en una caja de petri con agua destilada, para después colocar 15 coléoptilos en cada caja (5 cajas) y posteriormente regarlos con las soluciones producto de los macerados de cada estructura de la semilla de Maracuyá (*Passiflora edulis*, D. var. *flavicarpa*). Ver fig. 4a.

FIGURA 3a. PREPARACION DE LOS COLEOPTILOS



Para preparar, estas soluciones se procedió a macerar 100 grs. de cada estructura de la semilla del maracuyá: (testa, saco embrionario, embrión y semilla completa). Se les agregó 25 ml de alcohol al 10% y se dejaron durante 30 minutos, luego se pasaron por el papel filtro de No. 1, y con 6 ml del filtrado se regaron las 4 cajas con 15 colóptilos cada una, excepto el testigo que se estuvo regando con agua destilada y se volvieron a colocar en la cámara de cultivo, al segundo día se comenzaron a tomar datos y cada tercer día se observo la elongación del coléoptilo. Durante este tiempo se estuvieron regando con 6 ml de agua destilada diarios. Ver fig. 4b.

FIGURA 4b PREPARACION DE LOS MACERADOS



4.4.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL.

En esta fase se utilizó un diseño completamente al azar en donde los tratamientos fueron determinados por las diferentes soluciones extraídas, el cual consistió de 5 tratamientos con 15 repeticiones en condiciones homogéneas (Temperatura, luz, humedad). La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey al 0.1% y al 0.5% de significancia.

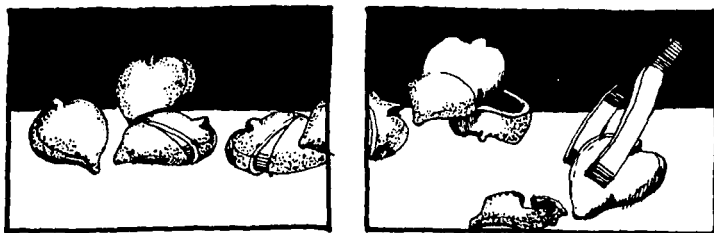
4.4.2.- TOMA DE DATOS

Los datos fueron tomados diariamente durante una semana en los cuales se observó el crecimiento longitudinal de los coléoptilos, con la ayuda de papel milimétrico, y poder así determinar el porcentaje de inhibición del coléoptilo, en los diferentes tratamientos.

4.5.- RESCATE DE EMBRIONES *IN VITRO* DE MARACUYÁ (*Passiflora edulis*, *D. var. flavicarpa*)

Se extrajeron las semillas de los frutos del maracuyá (*Passiflora edulis*, *D. var. flavicarpa*), ya maduros, se pusieron a remojar en agua con cloro al 10% durante 6 horas para remover el mucilago, seguido de esto, se enjuagaron perfectamente con agua corriente, posteriormente se procedió a eliminar la testa de cada semilla, dejando al descubierto el saco embrionario, procurando no dañar el embrión, toda esta etapa se realizó manualmente. ver figura 5a.

FIGURA 4a EXTRACCION DE LOS SACOS EMBRIONARIOS



Para luego desinfectar los sacos embrionarios, ya que por la forma en la que se encuentra el embrión dentro del saco embrionario este se encuentra en estado estéril.

Para la desinfección de los sacos embrionarios se colocaron en una solución de alcohol al 10% durante 5 minutos, para luego colocarlos en una solución de cloro al 15% también durante 5 minutos, una vez desinfectados y con la ayuda de la campana de flujo laminar, previamente desinfectada y de los mecheros que se mantuvieron encendidos durante este proceso, se enjuagaron con agua destilada-esterilizada. ver figura 5b.

FIGURA 4b DESINFECCION DE LOS SACOS EMBRIONARIOS



El medio de cultivo empleado fue el de Murashige y Skoog (MS) al 50% de su concentración de sales minerales, sin reguladores de crecimiento ya que únicamente en esta fase se va a determinar el porcentaje de germinación, días a germinación y porcentaje de contaminación. (ver. cuadro 4)

**CUADRO No. 4 MEDIO DE CULTIVO DE MURASHIGE Y SKOOG (1962)
AL 50% DE SU CONCENTRACION DE SALES**

<u>SALES INORGANICAS</u>	
MACROELEMENTOS (mM/l)	MICROELEMENTOS (mM/l)
NH ₄ NO ₃ 10.3	MnSO ₄ .H ₂ O50
KNO ₃ 9.4	H ₃ BO ₃50
CaCl ₂ .2H ₂ o 1.5	ZnSO ₄ .7H ₂ O15
MgSO ₄ .7H ₂ O625	KI 2.5
KH ₂ PO ₄625	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O..... .5
Na ₂ -EDTA.....50(M/l)	CoCL ₂ .6H ₂ O..... 0.05
FeSO ₄ .7H ₂ O.....50(M/l)	CuSO ₄ .5H ₂ O 0.05
<u>COMPUESTOS ORGANICOS</u>	
Myo-inositol..... 100 mg/l	Tiamina0.1 mg/l
Ac. nicotínico0.5 mg/l	Glisina2.0 mg/l
Pirodoxina.....0.5 mg/l	Sacarosa 30 g/l
Agar.....6 g/l	

Fuente: Gambrg, y cols. 1976.

Antes de llevarse acabo la siembra, todo el material fue esterilizado en el autoclave. Todo el material de cristalería junto con las pinzas y el bisturi fueron flameados, entre cada siembra y en cada tubo con el medio.

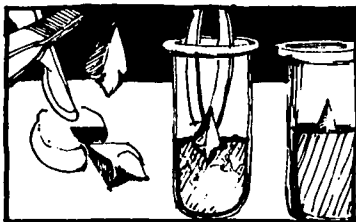
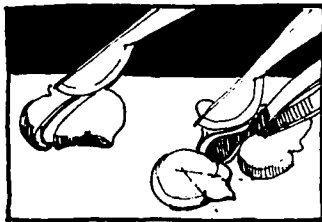
Una vez listo el material, se procedió a la siembra de la siguiente forma:

- Se colocaron los sacos embrionarios en el microscopio, con la ayuda de las pinzas y el bisturí, se les hizo un incisión en uno de los costados, y presionando en la parte superior para extraer el embrión con el endospermo.

- Una vez fuera se les volvió a hacer otros dos cortes lo más cercano del embrión sin dañarlo.

- Ya que está listo se coloca en el tubo que contiene al medio de cultivo enterrando la mitad del embrión o bien dejando la parte donde se le hicieron los dos últimos cortes hacia arriba, ver figura 5d.

FIGURA 4c SIEMBRA DE LOS EMBRIONES.



Una vez realizada la siembra, los tubos son llevados al cuarto de cultivo, en donde existe un ambiente controlado, el cual se encuentra con un periodo de 16 hrs de luz y una intensidad luminica de 3000 luxes, además de una temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.5.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL.

En la segunda fase no existió diseño experimental ya que como se dijo anteriormente se evaluó el porcentaje de germinación, tiempo de germinación y porcentaje de contaminación.

4.5.2.- TOMA DE DATOS.

La toma de datos para obtener el porcentaje de contaminación se tomaron cada tercer día, los datos de tiempo de germinación también cada tercer día y los de porcentaje de germinación se tomaron al final.

V.- RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1.- INHIBICION DEL COLEOPTILO.

En el bioensayo que se realizó se obtuvieron los resultados que se muestran en el cuadro (4)

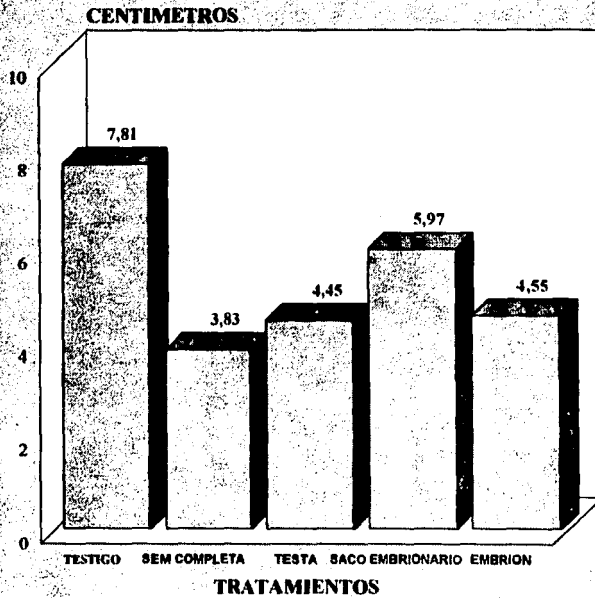
CUADRO No. 5 ENLONGACION DEL COLEOPTILO

No.	TRATAMIENTO	LONGITUD CMS.
1	TESTIGO	7.81
2	SEMILLA COMPLETA	3.83
3	TESTA	4.45
4	SACO EMBRIONARIO	5.97
5	EMBRION	4.55

En la gráfica 2 podemos ver que el testigo, como parámetro de comparación obtuvo un crecimiento normal, el tratamiento que menos se desarrollo fue el de semilla completa ya que en este tratamiento se unen las concentraciones de ácido abscísico (ABA) de todas las estructuras que conforman la semilla, sin embargo considerando las estructuras por separado, podemos decir que la que mayor presencia del inhibidor tuvo, fue la testa seguida de el embrión y por último del saco embrionario.

GRAFICA 2

INHIBICION DEL COLEOPTILO DE TRIGO



**CUADRO No. 6 ANALISIS DE VARIANZA DE INHIBICION DE
CRECIMIENTO DE COLEOPTILO DE TRIGO**

F.V	G.L.	S.C	C.M	F.C	F.T
TRAT	4	211.6675	52.92	13.51	5.69 * (0.5)
ERROR	70	274.1096	3.92		13.65 (0.1)
TOTAL	74	485.7772			

En el cuadro anterior podemos observar que existe una diferencia significativa al .05 de confiabilidad (*) entre los tratamientos, lo cual indica que hay algunos tratamientos que se desarrollaron más que otros.

Al realizar la comparación de medias (ver cuadro 6). Se puede observar que los tratamientos que mayor crecimiento del coléoptilo presentaron fueron los de: tratamiento 1 (testigo) con un crecimiento de 7.81 cms. de longitud y el tratamiento 4 (saco embrionario) con 5.97 cms. seguidos por el tratamiento 5 (embrión) con 4.55 cms., tratamiento 3 con 4.45 cms. y el tratamiento 2 (semilla completa) con 3.83 cms. de longitud.

**CUADRO No. 7 COMPARACION DE MEDIAS DEL
CRECIMIENTO DEL COLEOPTILO DE TRIGO
POR TUCKEY AL .05**

TRAT. 1	7.81	a
TRAT. 4	5.97	a
TRAT. 5	4.55	b
TRAT. 3	4.45	b
TRAT. 2	3.83	b

La dormición fisiológica es el resultado de bloqueos metabólicos en el embrión, sostenidos por la baja permeabilidad de la cubierta a los gases. Dichos bloqueos se manifiestan en la incapacidad del embrión para crecer y atravesar las cubiertas.

En los embriones de las semillas con dormición fisiológica, la actividad enzimática es baja, lo mismo que la producción de enzimas, coenzimas y ácidos nucleicos. Fundamentados en esto último, algunos autores han sugerido que la dormición fisiológica se origina de un bloqueo a la transcripción del genoma (Khan, 19975. Nikolaeva, 1978 y Osborne, 1981).

En muchas semillas con dormición fisiológica se han encontrado inhibidores de la germinación, por lo que dicha dormición se debe a la presencia de estas sustancias, y principalmente del ácido abscísico, ya que es muy abundante en el reino vegetal, y cuando se aplica, reduce la germinación de muchas especies. Existe una relación directa entre el contenido de tal ácido con la profundidad de la dormición.

Los inhibidores en las semillas con dormición fisiológica se presentan en las cubiertas, los tejidos nutritivos y el embrión. Y es la parte de los inhibidores que más dificulta la germinación ya que no se puede lixiviar, pues se encuentran en los tejidos no expuestos al ambiente (Copeland, 1976. Khan, 1977. Maguirre, 1972. Nikolaeva, 1969 y 1978 . Taylorson y Hendricks, 1977. Villiers, 1972. Walton, 1977).

Aunque los inhibidores desempeñan una función importante en las semillas con dormición fisiológica, no se le puede responsabilizar por completo de la dormición; hay evidencias de que tanto la falta de hormonas promotoras de la germinación como la incapacidad de sintetizarlas son algunas de las causas de la dormición fisiológica. (Jann y Amenn, 1971. Khan, 1975. Nikolaeva, 1978. Villiers, 1972. Waering, 1978).

Hasta ahora no se ha podido esclarecer si la dormición fisiológica se debe a un balance hormonal desfavorable a la germinación, o si este es consecuencia de los bloqueos metabólicos (Khan, 1995. Metzger, 1983).

Maguire (citado por Gelmond, 1978) y Taylorson y Hendricks, 1977. mencionan que existen mediciones directas de la permeabilidad de las membranas capaces de apoyar este punto de vista.

Jann y Amen (1977) proponen que la dormición fisiológica resulta de la represión del genoma, debido a un balance hormonal desfavorable a la germinación. Se ha encontrado que el ácido abscísico inhibe la síntesis de enzimas al restringir la producción de ácido ribonucleico mensajero y en general, de todos los ácidos nucleicos (Khan, 1975), (Walton, 1977).

Nikolaeva (1969 y 1978) considera que las cubiertas y tejidos nutritivos de todas las semillas, son barreras pasivas a la difusión de gases, y que restringen la respiración del embrión.

En las semillas quiescentes, esta restricción es tan débil que germinan casi a la misma velocidad con o sin cubierta, mientras que las semillas con dormición fisiológica es tan fuerte que se inhibe tanto la respiración como la germinación. El mismo autor afirma que

el tejido que más ejerce dicho efecto es el que se encuentra en contacto directo con el embrión, o sea, el endospermo o la testa.

El ácido abscísico, considerado dentro del grupo ha demostrado ser un inhibidor de la germinación de las semillas, la apertura estomatal, la inhibición de la alfa milasa y, en general del crecimiento vegetal. Se ha descubierto también que es responsable de la abscisión de órganos y de provocar el letargo de yemas,

EL ácido abscísico (ABA) es un regulador de crecimiento importante no solo en la germinación de las semillas, sino en toda la planta en general, aparece jugando un rol de inhibición en el desarrollo del embrión. (Hudson, T. y cols.)

Dado que el (ABA) es soluble en agua y alcohol, y generalmente no ejerce una acción específica, cuando se aplica en extractos acuosos obtenidos al remojar varias horas semillas con dormición provocada por (ABA) inhibe la germinación tanto de la especie de la que se obtuvieron, como de otras plantas, (Mc. Donough, 1977) y (Nikolaeva, 1969), en las que en caso de haber germinación se producen rídiculas cortas, deformes y necrosadas de la punta (Anaya y Rovalo, 1972), (Brookman, 1976), Fairlamb y Davidson, 1976) y (USDA, 1952).

Altos niveles de este inhibidor pueden considerarse responsables de la formación de embriones rudimentarios, el (ABA) tiende a incrementarse con la maduración de el fruto e induce a la dormición. (Hudson, T. y cols.)

La testa y el saco embrionario llegan a tener la misma cantidad de inhibidores, ya que este pasa de las células muertas de la testa al saco embrionario, al momento de la inhibición de la semilla. (op.cit).

En el embrión es difícil que el (ABA) se disuelva como en las cubiertas, por lo tanto, al encontrarse en esta estructura no existe forma de lixiviarlo o eliminarlo. (Hudson, T. y cols.)

En general la inhibición es temporal y desaparece cuando la semilla se coloca en una solución libre de (ABA). (op. cit)

Estos resultados se deben a que en el tratamiento 1 que es el testigo y el cual nos sirvió como parámetro de comparación para los otros tratamientos, se regó con pura agua destilada y tubo un crecimiento normal.

El tratamiento 4 (saco embrionario) es el que más se desarrollo después del el testigo esto debido a que existia menor cantidad de inhibidores en esta estructura, ya que al imbibirse la semilla el (ABA) se lixivio pasando al la siguiente estructura la cual es el embrión.

Los tratamientos que no tuvieron diferencia estadística son: El tratamiento 5 (embrión), el cual contiene inhibidores los cuales no pueden ser lixivados ni eliminados de ninguna forma además de los inhibidores del saco embrionario.

El tratamiento 3 (testa), es la estructura de la semilla, en el cual se encuentra la mayor cantidad de inhibidores

Y tratamiento 2 (semilla completa), En este tratamiento se concentro la los inhibidores de todas las estructuras de la semilla y por lo tanto el que menos desarrollo tuvo, y por lo tanto el que mayor inhibición y/o menor crecimiento.

En general la inhibición es temporal y desaparece cuando la semilla se coloca en una solución libre de (ABA). (op. cit)

Estos resultados se deben a que en el tratamiento 1 que es el testigo y el cual nos sirvió como parámetro de comparación para los otros tratamientos, se regó con pura agua destilada y tubo un crecimiento normal.

El tratamiento 4 (saco embrionario) es el que más se desarrollo después del el testigo esto debido a que existía menor cantidad de inhibidores en esta estructura, ya que al imbibirse la semilla el (ABA) se lixivio pasando al la siguiente estructura la cual es el embrión.

Los tratamientos que no tuvieron diferencia estadística son: El tratamiento 5 (embrión), el cual contiene inhibidores los cuales no pueden ser lixivados ni eliminados de ninguna forma además de los inhibidores del saco embrionario.

El tratamiento 3 (testa), es la estructura de la semilla, en el cual se encuentra la mayor cantidad de inhibidores

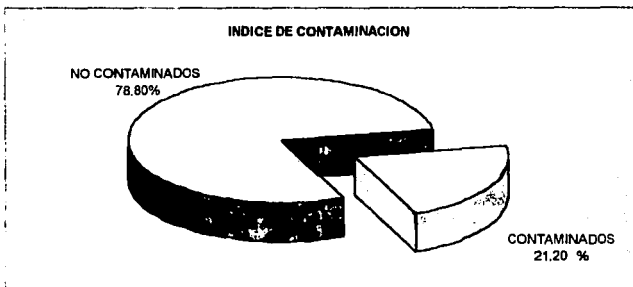
Y tratamiento 2 (semilla completa), En este tratamiento se concentro la los inhibidores de todas las estructuras de la semilla y por lo tanto el que menos desarrollo tuvo, y por lo tanto el que mayor inhibición y/o menor crecimiento.

5.2.- CULTIVO DE EMBRIONES IN VITRO DE MARACUYÁ.

5.2.1.- CONTAMINACION.

El porcentaje de contaminación que se obtuvo fué de 21.2% (Gráfica 3.)

GRAFICA 3 INDICE DE CONTAMINACION



Erlinda, P. y M. B. Palma, 1991. Reportan un 43% de contaminación en embriones de coco, desinfectados con cloro al 20% durante 20 minutos y un porcentaje de germinación del 42.7%. Rghuramulo. y Sreenivasan, 1989. En cultivo de embriones de café obtuvieron un 20% de contaminación. y Reuueni, Shlesinger y Lavi. obtuvieron un 30% de contaminación en cultivo de embriones de papaya durante el primer mes aumentando paulatinamente hasta llegar al 100% de contaminación en el tercer mes.

En un principio existen cuatro fuentes de infección: la planta (su exterior o su interior), el medio nutritivo (insuficientemente esterilizado), el aire y el operado (trabajo poco preciso). La más importante de estas condiciones es la planta misma, el material vegetal debería ser bien esterilizado antes de su aislamiento in vitro (Pierik, 1990).

Zimmerman, (1991). Atribuye la contaminación a dos fuentes: la superficie del material, tejido del explanto y a los métodos de los procedimientos en el laboratorio.

Algunos de los microorganismos se desarrollan en los medios de cultivo pero, hay factores que inhiben la proliferación, tales como altas concentraciones de sales y azúcar además el pH. Aunque hay organismos que se adaptan rápidamente a estas condiciones.

La contaminación en el estado 1 (establecimiento aséptico) o inoculación se debe a la inadecuada preparación del inoculo.(op. cit.)

en el cultivo de embriones no se encuentran generalmente problemas de desinfección. Las semillas maduras se encuentran desinfectadas en su exterior, a partir de ellas se obtienen los embriones abriendo la cubierta seminal. Si las semillas están todavía inmaduras, el fruto aún cerrado permanece estéril, y al abrirlo se obtienen los embriones sin infectar. (Pierik, 1990).

Hay que tener en cuenta que cultivos aparentemente estériles, no son de echo siempre estériles. Si el origen de la infección esta en los tejidos interiores de la de la planta, la infección solo se hace visible cuando el centro infeccioso es cortado, y se pone en contacto con el medio relativamente.

Se pueden producir también cultivos aparentemente estériles debido a que el crecimiento del cultivo puede tener lugar u n medio relativamente pobre, en el cual los microorganismos es difícil que se desarrollen (op.cit:)

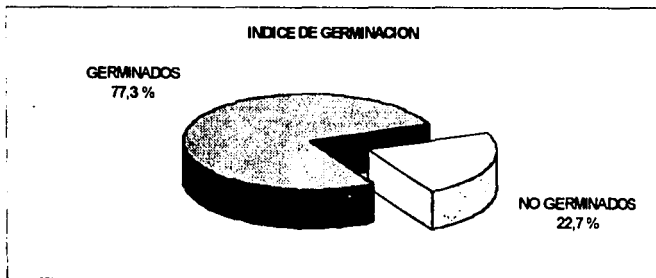
Entonces las infecciones solo se hacen visibles, si se hace una inoculación en un medio más rico, o si tiene lugar una mutación del microorganismo, que le permita desarrollarse en un medio más pobre. (Pierik, 1990.)

El método de desinfección empleado en el experimento resulto ser el adecuado, esto debido principalmente a la etapa de esterilización del material ya que al ser extraído el saco embrionario que es con la estructura con la cual se trabaja en la campana de flujo laminar, las concentraciones fueron muy bajas para no dañar al embrión, ya que si se utilizaban concentraciones más altas de alcohol y cloro o se dejaban durante más tiempo se podrían llegar a dañar los embriones, esto debido a su tamaño y lo delgado del saco embrionario, además de el manejo del material al momento de la siembra. Además de el manejo del material durante la siembra del inoculo, ya que al trabajar en el microscopio los embriones permaneció demasiado tiempo a la intemperie lo cual también puede llegar a ser una causa de el porcentaje de contaminación obtenido en el experimento.

5.2.2.- GERMINACION DE LOS EMBRIONES.

Por lo que corresponde al porcentaje de germinación se obtuvo el siguiente resultado:

GRAFICA 4 PORCENTAJE DE GERMINACION



El rescate de embriones se desarrolla favorablemente en un medio de Murashige y Skoog al 50% de su concentración de sales minerales. (Zimmerman, 1991.)

Ya que esta concentración promoverá un mayor numero de brotes al momento de la desdiferenciación y así asegurar un enraizamiento, aunque se ha demostrado que existe un mayor desarrollo adicionando 2, 4 - D o una mezcla de 1:1 se Auxinas y Citokininas para promover su desarrollo. (op. cit.)

Los subcultivos provenientes de embriones se cultivan sobre medios adicionados con Auxinas para promover la diferenciación de los órganos. (Zimmerman, 1991)

La germinación espontanea de embriones completamente maduros, se da adicionando GA_3 , reportando altos índices de enraizamiento en *citrus. spp.* en *Musa* se da suplementando con (ZEA) zeatina. (Op. cit.)

En experimento se utilizo medio de Murashige y Skoog al 50% de su concentración de sales minerales, obtiviéndose un 77.3% de germinación, pudiéndose incrementar con el uso de AG_3 adicionándolo al medio; en comparación con el cultivo in vitro de segmentos nodales realizado por Roderick, 1991. en el cual se obtuvo un 50% de enraizamiento, además de un largo periodo de enraizamiento que va de 7 a 11 semanas y un desarrollo muy lento.

Varias especies tropicales y subtropicales actualmente se reproducen por medio de embriones, provenientes de frutos ya maduros tales como: *Carica papaya*, *cocos nucifera*, *coffe arabica*, *hevea brasiliensis*, *citrus, spp.* *Musa*, *avocado*

En el rescate de embriones en 3 semanas se obtienen plantulas de tamaño considerable de 7 cms, vigorosas y con 5 a 6 hojas, listas para micropropagarse por medio de microestaquillado el cual se lleva aproximadamente 2 semanas en enraizar, obteniéndose en este tiempo plantas que servirán como portainjerto de una variedad más productiva.

VI.- CONCLUSIONES

- 1.- La información bibliográfica acerca del cultivo del Maracuyá (*Passiflora edulis. D. var flavicarpa.*) es escasa y difícil de conseguir.
- 2.- Es segura la reproducción sexual que la asexual, pero mucho más rápida y segura la reproducción *in vitro*.
- 3.- Uno de los principales problemas de la multiplicación asexual es la susceptibilidad a ser infectada por el hongo *fusarium sp.* lo cual puede ser eliminado por el cultivo de embriones *in vitro*.
- 4.- Lo tardado de la germinación, se debe a la presencia de inhibidores de crecimiento en las diferentes estructuras de la semilla.
- 5.- La estructura que mayor concentración del inhibidor resulto tener, fue la testa, la cual tiene que ser eliminada para poder acelerar la germinación.
- 6.- El cultivo *in vitro* de embriones permite acelerar la germinación de los embriones , de 3 semanas a 1 semana.
- 7.- En lo, que a la esterilización se refiere podemos decir que fue aceptable y, que interacciona con el porcentaje de germinación de los embriones como podemos ver en la (gráfica 4), además a modo de sugerencia una mayor investigación para embriones de este tipo en este rubro.
- 8.- Podemos decir que la técnica de rescate de embriones es recomendable para cultivos con problemas de latencia o dormancia.

9.- - Dado que el cultivo de embriones maduros presenta uno de los menores índices de contaminación, permite crear un banco de germoplasma con cultivares resistentes a enfermedades y plagas existentes en los climas tropicales y subtropicales.

10.- El cultivo del maracuyá presenta una gran perspectiva para la agricultura de las zonas con las condiciones adecuadas para su cultivo, ya que es bien pagado en los mercados Europeos.

BIBLIOGRAFIA

- Anaya, A. L. y Rovalo, M. 1972 "Alelopatía en plantas superiores: diferencia entre el efecto de la presión osmótica y alelopáticos sobre la germinación de algunas plantas de la zona cálida-húmeda de México", Resúmenes del 1er Congreso latinoamericano de botánica, Soc. Bot. de México, México, pag 84.
- Anónimo. 1982. "International Potato Center Annual Report 1982. International Potato Center, Lima, Perú.
- Arriola, J. F. Menchú, Rolz, C., 1976. "Caracterización, Manejo y Almacenamiento de algunas frutas tropicales" Instituto Centro americano de Investigación y Tecnología Industrial, División de Investigación Aplicada, Guatemala, pag: 25-27.
- Avilán, R. L., Leal, P. F., Bautista, A. D., 1989. "Manual de fruticultura" edit. América C. A. Venezuela. pag: 993-1022.
- Banafuzi, N. M. S., 1978. "El cultivo de la granada china amarilla o Maracuyá" Memorias de la 1ra. reunión Internacional y 2da. Nacional. "De frutos Nativos e introducidos con demanda nacional e internacional" 1994. C. P. Montecillos, Méx.
- Bidwell, R. G. S., 1979. "Fisiología vegetal" Edit. AGT. Editor, Méx. pags. 444 - 447.
- Brookman-Amisshah, J. 1976. "Cumarin-like substances in the fruit of *Terminalia ivorensis* A. Cev. inhibit its germination", en Asakawa, S (ed) Proceedings of Second International Symposium on Physiology of Seed Germination, Japon, pag: 33 - 49.
- Bulard, C., and Le page-Degivry, M. T., 1968. C.R. Acad. Sci., Ser. D 266:356-359.

- Camacho Morfín F., 1994 "Dormición de semillas causas y tratamientos" edit. Trillas. México pags.125.
- Colegio de Postgraduados Chapingo, 1994. "1era. Reunión Internacional y 2da. Nacional de Frutales Nativos e Inducidos con Demanda Nacional e Internacional" Memorias. Montecillo Mex. pag: 85- 265
- Copeland, L. O. 1976. "Principle of seed science and technology; Burger Publishing Company, Estados Unidos, 306 pags.
- Cruz, P. F., 1983. "Propagación in vitro de Manzana (*Malus plumillamil*); Tesis U. N. A. M. F. E. S. Cuautitlán, Edo. Méx.
- Duran, G. J., 1993. "*Cultivo in vitro de Cordyline Terminalis*" a partir de segmentos nodales, Tesis F. E. S. Cuatitlán U. N. A. M.
- Erlinda, P. R. y Palma, F. M. B., 1991 " Store and transport of zigotyc embryos of *cocos nucifera* L. for in vitro culture". Plant. Resur. News. 1991. 86. 1-4
- Esau. K., 1976. "Anatomia Vegetal" Edit. Omega. Barcelona España. pag. 641- 647
- Evans. A. D. y cols. 1986. "Handbook of plant cell culture" Vol. 4. Techniques and Aplications. Edit MacMillan. U. S. A. pag 43- 96.
- Fairlamb, J. y Davidson, J., "germination of Teak seed peliminare evidence of a chemical infibitor" en Asakawa, S (ed), Proceedings of a second International Symposium of Physiology of Seed germination, Japon, pags: 73-80.
- Fruit World and Market Grower (1963). Marzo 5, Revista
- Gelmond, H., 1978. "Physiological aspects of seed germination", Seed. Sci. and Technol. vol. 6 (3), págs: 625-639.

- González, M. A., 1991. "Rescate in vitro de embriones inmaduros de durazno *Promus L. Butsch* "Flordaprince" Tesis. C. P. U. A. CH., Chapingo Méx.
- Hannig, E. 1904. "Zur Physiologie pflanzlicher Embryonen. I. Ueber die Cultur von Cruciferan-Embryonen ausserhalb des Embryosacks". Bot. Zotg. 62:45-80.
- Hartmann, H. T. y Kester. D. E., 1971. "Propagación de plantas, principios y prácticas". Trad. Marino. A. A. CECSA, México, pag. 809
- Hatano, K., 1976. "Breaking dormancy of some conifer seeds with silver nitrate and its mechanisms", en: Asakawa, S. (ed) Proceedings of second international symposium on physiology of seed germination, Japón, pags: 89-97.
- Henny, R. J. 1980. "In vitro germination of *Maranta leuconeura* embryos". HortScience 15:198-199.
- Jagtlan, J; Chan, H; Sakai, W.: 1988 "Tropical fruit processing", Academic press, Inc, California, U. S. A., pag: 149-404.
- Jann. R. C. y Amen. D. R., 1977. "What is germination?", en: Khan, A. A. (ed) Physiology and biochemistry of seed dormancy and germination, Elsevier/ North Holland Biomedical Press, Holanda. pags: 7-27.
- Khan, A. A., 1975. "Primary, preventive and permissive roles hormones in plants systems", Bot. Rev. vol. 41, págs, 391-420.
- Khan, A. A., 1977. "Seed dormancy Changing concepts and theories", en: Khan, A. A., Physiology and biochemistry of seed dormancy and germination", Elsevier/North Holland Biomedical Press., Holanda, págs: 29-49.
- Larqué, S. A. y Rodríguez, G. M. T., 1993. "Fisiología vegetal experimental" edit Trillas, Méx. D. F. Pag. 59 - 62.

- Leal, P. F. y Grazia, A. M., 1986. "Manual de prácticas de fruticultura" edit. IICA., San José Costarica. Págs: 155-168
- Lenz, L. W. 1955. "Studies in *Iris* embryo culture I"; Germination of embryos of the subsetion *Hexapogon* Benth (sect. *Regelia* sensu Dykes). *Aliso* 3:173-182.
- León, J., 1987. "Botánica de los cultivos Tropicales" IINCA, San Jose, Costa Rica. Pag: 402 - 404
- Maguirre, J. D., 1980 "Seed dormancy and germination", *Adv. in Res. and Technol. of seeds*, Parte 5, págs. 41-67,
- McDunough, D., 1975 "Seed physiology", *Range Sci.* vol. 4, págs: 155-184.,
- Medina, J. et. alii. 1980. "Maracuya da cultura ao processamento e comercializacao". Sao Paulo, Instituto de Tecnologia de Alimentos. Gouverno do Estado de Sao Paulo. Serie Frutos Tropicais, No 2: 5 - 106
- Metzger, J. D., 1983. "Role of endogenous plant growth regulators in seed dormancy of *Avena Fatua*. (II). Gibberellins", *Plant Physiol.* vol. 73 (3), págs: 791-795
- Morfin C. F. 1994 "Dormición de semillas causas y tratamientos" edit. Trillas Méx. D. F. Pag: 5, 9-12,
- Murashige T., 1974 "Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.*
- Niembro, R. A., 1979 "Semillas Forestales, PATENA, México, 137 págs.
- Nikolaeva, G. M., 1969. "Physiology of seed dormancy in seeds", Trad. Shapiro S. IPST, Press., Israel, 220 págs.
- Nikolaeva, F. M., 1978. "Factors controlling the seeds dormancy pattern", en: Khan, A. A. (ed.) *Physiology and biochemistry the seed dormancy and germination*, Elsevier/North Holland Biomedical Press., Holanda, págs: 50-73.

- Norstog, K. 1972. "New synthetic medium for the cultures of premature barley embryos". *In vitro*. 8: 307 - 308.
- Ochoa, F. E., 1983. "Efecto de AIB, ANA y Carbon activado sobre el enraizamiento de fresa in vitro" Tesis U. N. A. M. F. E. S. - Cuautitlán, Edo. Méx.
- Osborne, D. J., 1981. "Dormancy as survival strategem", *Ann. of Aplic. Biol.* vol. 98 (3), págs: 525-531, 1981.
- Pierik. R. L. M., 1990 "Cultivo in vitro de las plantas superiores". Mundi -Prensa Madrid, España Pag: 326.
- Raghavan, V. 1980. "embryo culture" Academic press, U. S. A.
- Randolph, L. F. and Cox. L. G. 1943. "Factors influencing the germination of iris seed and the relation of inhibiting substances to embryo dormancy" *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 43:284-300.
- Reuveni, O. Sclesinger, P. R. and Lavi, U., 1990. "In vitro clonal propagation of dioecious *Carica papaya*" *Plant. Cell. Tiss. and Org. Cul.* vol. 20. 41-46
- Rgghuramulo, Y; Sreenivasan, M. S. and Ramaiah, P. 1989. "Regeneration of coffee plants through tissue culture techniques in India". *Jour. of Coffe Resch.* vol 19. No.1. 30-38
- Roberts, E. H. y Smith, R. D., 1977. "Dormancy and pentose phosphate pathway" en: Khan, A. A. (ed.), *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*, Elsevier/North Holland Biomedical Press., Holanda, págs. 385-411.
- Roderick, A. D; 1991. "*In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species" *Plant. Cell. Tiss. and Org. Cult.* 26. 23-27.
- Rolston, Ml, P., 1978. "Winter impermeable seed dormancy", *The Bot. Rev.* vol. 4 (3), págs. 385-411.

- Rosell, H. C. y Villalobos, A. V. 1991. "Fundamentos teóricos prácticos del cultivo de tejidos vegetales". FAO, Roma. Italia.
- Schooler, A. B. 1960, "The effect of giberel and gibberellic acid (Ksalt) in embryo culture media for *Hordeum Vulgare*. Agron. J. 52 :411.
- Serna, V. J., 1994. "El cultivo del maracuyá" CORDICAFE. Colombia.
- Skene, K. G. M., 1969. "Stimulation of germination in mature bean embryos by gibberlic acid" Planta 87: 118 - 192.
- Steward, F. C. 1970. "Totipotency, variation and clonal development of cultured cells" E. Adeavour 29: 117 - 124
- Taylor, G. y cols., 1971. "Las plantas con flores". edit. Reverte, España. pag. 98 - 111.
- Taylorson, R. B., y Hendricks, S. B., 1977. "Dormancy in seeds", An. Rev. Plant. Physiol. vol. 28, págs: 331-354.
- USDA., 1952. "Testing agricultural and venetable sends", Agric. Hand Book, núm. 30, pág. 440.
- Venn, H., 1963. " The effect of various growth regulators on embryos of *Capsella bursa-pastoris*, growing, *in vitro*, Acta. Act. Nerri. 12: 129 - 171.
- Walton, D. C., 1977. "Abscisic acid and seed germination", en Khan, A. A. (ed.), The physiology an biochemistry of seed dormancy and germination, Elsevier/North Hollend Biomedical Press., Holanda, págs. 145-156.
- Wareing, J. R., 1978. "Abscisic acid as a natural growth regulator", Phil. Trans. R. Soc. vol. 284, págs. 483-498.
- Willam. M. R. y Mrogiski. L. A. 1991. "Cultivo de tejidos en la agricultura Fundamentos y aplicaciones" Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia

págs: 295-312.

-Zuang, H., Barret, B. and Beau, C., 1992 "Nuevas especies frutales" Mundi-prensa, Madrid. España. pag: 151-155.

- Zimmerman, R. H. y Deberg, P. C., 1991. "Micropropagation Technology and Applications". Kluwer Academic Publisher. U. S. A.