



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Biología

"Inducción de respuestas morfogénicas
in vitro a partir de distintas estructuras de mamey
(*Pouteria sapota*) [(Jacq) H.E. Moore & Stearn]"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)
PRESENTA

ANA CLAUDIA SÁNCHEZ ESPINOSA

DIRECTOR DE TESIS: DR. VICTOR MANUEL CHAVEZ AVILA

MÉXICO, D. F.

JUNIO 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo económico proporcionado por el Programa de Becas Nacionales para estudios de Posgrado del **CONACYT**

Programa de Becas Nacionales para Estudios de Posgrado de la **DGEP** de la UNAM.

Programa de Apoyos Económicos a Estudiantes de Posgrado de la **DGEP** de la UNAM.

Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica. Proyecto No. **IN227805**

DEDICATORIA

A Joss y Erick

El amor es una mar muy ancha que nos envuelve con ternura, nos sostiene con firmeza, nos eleva al infinito y nos reinventa en cada instante, pero sobre todo nos sumerge en un profundo sueño, un sueño emocionante, apasionante, abrumador, el cual finalmente, nos hace sentir vivos.

Gracias por ser mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Victor Chávez por su apoyo y amistad, por darme la oportunidad de crecer académicamente bajo su tutela.

A la Dra. Araceli Zavaleta por su apoyo académico en este estudio, por su paciencia y sobre todo por sus consejos como mujer profesionalista y madre.

Al Dr. Martin Ricker por el apoyo económico brindado para la obtención del material biológico. Por su apoyo académico y por su amistad.

Al Dr. Humberto López por sus aportaciones académicas y por permitirme usar su laboratorio sin restricciones.

A los miembros del jurado, particularmente a las doctoras Judith Marquez y Rocío Cruz por el esfuerzo realizado en la revisión tan prematura del documento y por sus acertados comentarios.

Al Laboratorio de Apoyo a la Investigación del Jardín Botánico y a la M. en C. Estela Sandoval por permitirme realizar la microtécnica de algunas muestras y a la amistad que años atrás me brindó.

A los responsables de la Biblioteca del Instituto de Biología, pues sin la realización eficiente de su trabajo la recopilación bibliográfica no hubiera sido posible.

Muchas gracias a mis amigos y compañeros del laboratorio Octavio González y Julio César Flores por su ayuda y apoyo incondicional en las buenas y en las malas, sin ustedes muchos momentos hubieran sido más amargos.

A mis alumnos Alejandra, Felipe, Edgar, Jesús y Neri, por su paciencia, comprensión y confianza. Porque me impulsan a ser mejor, a actualizarme, a cuestionar, pero sobre todo por su sinceridad y apoyo incondicional, además de vivir con ellos momentos muy agradables.

A la Biól. Barbara Estrada por su apoyo en las actividades académicas y docentes del laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio: Sergio, Dalia, Isabel, Elisa, Vicente, Minerva, Samanta, Susana, Fernando, por la convivencia diaria.

A mis amigos entrañables: Claudia Bretón, Jorge Rizo, Edith Zárate, Xavier Velencia, Violeta Patiño, Ricardo García, Joaquín Cifuentes, Rosalva Vázquez, Josefina Herrera,

Patricia Guevara, mi gratitud y mi cariño, siempre encuentro en ustedes un consejo, una sonrisa, un regaño pero sobre el cariño necesario para seguir adelante.

Mi mas grande y especial agradecimiento a Doña José, y a Lulú, porque sin su apoyo no hubiera podido terminar este trabajo, por cuidar y querer a mi hijo mientras yo perseguía mis metas, pero sobre todo porque nunca me he sentido la nuera, ni la cuñada, sino la hija y la hermana, y eso me hace ver, entre otras cosas, lo afortunada que soy. A mis sobrinas sobrinos por los buenos momento vividos.

A Ernestina Espinosa y Manuel Sánchez, los autores de mi vida, ahora comprendo todo...lástima que ya no puedo corregir mis acciones de la niñez ni de la adolescencia Sólo puedo decirles que la educación que me dieron fue todo un éxito, me ha dado lo necesario para ser feliz y hacer lo mejor en mi vida, me enseñaron a no vencerme sin intentar, a no dejarme derrotar, a enfrentar honestamente los problemas y a disfrutar de los triunfos. Gracias por su esfuerzo, por sus angustias y por su apoyo en todo y todos, lo momentos de mi vida, espero no defraudarlos jamás.

A mi hermano Marco A. Sánchez, gracias por ser como eres, tu visión del mundo es muy distinta y el compartirla conmigo me abre la mente y el espíritu.

A mi familia, a mis abuelos, mis tíos, mis primos y primas (especialmente a Jatciri) por ser siempre una familia tan unida, en la que envidias o rencores no tienen cabida, solo hay alegrías y apoyo incondicional.

A José Luis Villarruel y a Erick, mi familia, que sufrieron mi ausencia constante, mis problemas, mi mal humor y aún así, siempre recibí su apoyo y comprensión pero sobre todo, siempre me han hecho sentir bien, me han hecho sentir importante me han hecho sentir querida y con eso, soy muy feliz.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Ubicación Taxonómica	2
2.2 Generalidades de <i>Pouteria sapota</i>	3
2.3 Importancia económica	7
2.4 Propagación tradicional de <i>Pouteria sapota</i>	9
2.5 Cultivo de Tejidos Vegetales.....	11
2.5.1 Cultivo de Tejidos en especies frutales.....	13
2.5.2 Cultivo de Tejidos en la Familia Sapotaceae.....	18
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo General	23
4.2 Objetivos Particulares	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 Colecta de material biológico	24
5.2 Establecimiento de los cultivos <i>in vitro</i>	24
5.2.1 Desinfección de material biológico.	24
5.3 Tratamientos de inducción morfogénética	26
5.3.1 Medios de cultivo.....	26
5.3.2 Reguladores del crecimiento	27
5.4 Cultivo de las hojas.....	27
5.5 Cultivo de endospermo	28
5.6 Cultivo de embriones	28
5.7 Microtécnica	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1 Establecimiento del Cultivo <i>in vitro</i>	31
6.2 Cultivo de las hojas.....	34
6.3 Cultivo de endospermo	47
6.4 Cultivo de embriones	59

7.	CONCLUSIONES	71
8	COROLARIO.....	73
9	ANEXOS.....	75
10	LITERATURA CONSULTADA.....	77

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

		Página
Fig. 1	Generalidades de <i>Pouteria sapota</i>	6
Fig. 2	Metodología general para el establecimiento de explantes provenientes de individuos de campo de <i>Pouteria sapota</i> .	30
Fig. 3	Respuesta morfogénica inducida en explantes de hoja de <i>Pouteria sapota</i>	62
Fig. 4	Anatomía de la hoja de <i>Pouteria sapota</i>	63
Fig. 5	Cambios morfoanatómicos de la hoja promovidos por el cultivo de tejidos.....	64
Fig. 6	Cambios morfológicos en el endospermo en el tratamiento SH + BAP 0.5 mg/l.....	65
Fig. 7	Respuesta morfogénica presentada en explantes de endospermo cultivados en medio Litz y SH con reguladores del crecimiento.	66
Fig. 8	Cultivo de endospermo en medio SH sin reguladores del crecimiento.	67
Fig. 9	Callo regenerado a partir de endospermo en el tratamiento SH + BAP 0.5 mg/l a 95 días en medio de inducción	68
Fig. 10	Explante cultivado en medio SH + 2mg/l Bap.	69
Fig. 11	Respuesta morfogénica en embriones inmaduros	70
Tabla 1.	Calidad química nutritiva del fruto del mamey según Morera	7
Tabla 2.	Embriogénesis somática en diferentes especies de árboles frutales tropicales	16
Tabla 3.	Especies de frutales propagadas por organogénesis	18
Tabla 4.	Combinación factorial de auxina / citocinina para la inducción morfogénica en tejidos somáticos de <i>Pouteria sapota</i>	27
Tabla 5.	Cultivo <i>in vitro</i> de hojas de <i>Pouteria sapota</i> en medios sólidos (Litz y SH).	35
Tabla 6	Porcentaje y tipo de respuestas presentadas en hojas de <i>Pouteria sapota</i> a 40 días de tratamiento.....	36
Tabla 7	Respuesta morfogénica en tejido de endospermo de semillas inmaduras de <i>Pouteria sapota</i> a los 70 días de tratamiento.....	49

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2, 4 diclorofenoxiacético
AIB	Ácido indol butírico
AIA	Ácido Indólacético
AC	Agua de coco
BAP	Bencilaminopurina
c	Callo
K	Cinetina
e	Epidermis
cg	Cuerpo globular
exp	Explante
ff	Fibras floemáticas
f	Floema
hv	Haces vasculares menores
HC	Hidrolizado de caseína
l	Laticíferos
MS	Medio Murashige y Skoog
SH	Medio Schenk y Hildrebrandt
mc	Meristemo concentrico
mp	Mesofilo en empalizada
2iP	N-(3-metil-2-butenil)-1H-purina 6- amina
nc	Nervadura central
pd	Peridermis
PVP	Polivinil pirrolidona
PsE	Seudo embrión
Susp.	Suspensor
t	Taninos
mf	Meristemos en fila
tv	Tejido vascular
x	Xilema
NEM	Nódulos embrioidales
ms	Mesófilo esponjoso
ANA	Ácido naftalenacético
hp	Hipocótilo
ct	Cotiledón
emb	Embrioides
eg	Estructura globular
PsE	Pseudoembrión

Inducción de respuestas morfogénicas *in vitro* a partir de distintas estructuras de mamey, [*Pouteria sapota* (Jacq) H.E. Moore & Stearn]

RESUMEN

Pouteria sapota "Mamey" es un árbol de cultivo menor con creciente interés en los últimos años. Los escasos estudios están enfocados a buscar métodos de propagación y post-cosecha en el fruto. El presente estudio reporta el cultivo de tejidos de explantes de mamey para establecer un protocolo de regeneración, dado que las técnicas tradicionales de propagación vegetativa son limitadas y no permiten selección de genotipos a corto plazo. Se utilizaron hojas y frutos de individuos adultos, la desinfección del material biológico para establecer los cultivos *in vitro* se logró con el lavado en agua corriente, la inmersión breve en alcohol al 70% y la inmersión del material en una solución de cloro comercial al 20% v/v durante 20 minutos. A partir de individuos adultos se exploró la capacidad de morfogénesis de hojas, endospermo y embriones en medios Litz y SH sólido y líquido adicionados con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento. Los explantes con respuesta se procesaron para cortes en parafina a 10 μ m. La tinción se realizó con safranina y verde fijo FSF. Las hojas en medio Litz + 0.2 y 0.5 mg l⁻¹ de 2,4-D promovieron en el tejido parenquimático de nervadura central, la formación *de novo* de puntos meristemáticos de arreglo concéntrico, cuyas células dieron origen a haces vasculares jóvenes. El endospermo en SH + 0.5 y 2 mg l⁻¹ de BAP formó callo proembriogénico, los análisis histológicos revelaron la presencia de proembriones que, en etapas más avanzadas, perdieron la capacidad embriogénica, formando estructuras embrioidales que carecen de la diferenciación de un protodermo y meristemo fundamental. Por otro lado los embriones sometidos a tratamientos de inducción presentaron muy baja respuesta a los tratamientos, por lo que se consideraron poco consistentes. Aunque no se logró aquí, se concluye que la regeneración *in vitro* de *Pouteria sapota* puede ser factible si se exploran más los diferentes tipos y concentraciones de reguladores del crecimiento, así como con factores físicos como son temperatura, y pH, que permitan el correcto desarrollo de las estructuras formadas. El endospermo y la nervadura más cercana al pecíolo en las hojas,

pueden ser explantes potenciales de inducir hacia la morfogénesis. Es necesario para esto profundizar los estudios relacionados con su desarrollo y fisiología que nos den más información sobre la especie. El presente estudio genera información importante para la planeación de futuros experimentos de regeneración *in vitro* en esta especie.

**Induction of morphogenetic answers *in vitro* from different structures from mamey, [
Pouteria sapota (Jacq) H.E. Moore & Stearn]**

Abstract

Pouteria sapota "Mamey" is a tree of reduced crop with increasing interest in the recent years. The few studies are focused to look for propagation methods and post-harvests in the fruit. The present study reports the tissue culture of explants of mamey to establish a regeneration protocol, since the traditional techniques of vegetative propagation are limited and they do not allow selection of genotypes in the short time. Leaves and fruits of adults were used, disinfection of the bacteriological agents to establish the crop *in vitro* was obtained with water washing, 70% alcohol immersion briefly, and immersion of the material in a commercial 20% chlorine solution v/v during 20 minutes. Morphogenetic response of leaves, endosperm and embryos was explored, and they were cultivated in Litz and SH solid and liquid medium and added with different concentrations from growth regulators. The explants were processed in paraffin to be cutting at 10 μ m. Stain was made with safranin and fast-green FCF. Leaves in Litz medium + 0,2 and 0,5 mg l^{-1} of 2,4-D promoted in parenchymatic tissue of middle boundle, formation of *in novo* of concentric meristematics points, whose cells gave origin to young vascular boundles. Endosperm in 2 SH + 0,5 and mg l^{-1} of BAP formed pro-embriogenic callus. Pro-embryogenic cells were revelated by histological analyses, and lost in subsequents stages, forming embrioidal structures that lack the differentiation of protoderm and fundamental meristem. On the other hand, embryos in induction treatments displayed very low answer to the treatments, and they were considered inconsistent. Although it was not obtained here, a conclussion is that *Pouteria sapota* *in vitro* regeneration can be feasible if different concentration of growth regulators, as well as physical factors as temperature, and pH, are explored, that allows the correct development of the formed structures. Endosperm and the middle boundle nearest to peciole, can be potentials explants to induce morfogenetic responce. Related syudies to its development and physiology are necessary to to give us more information on this species. The present study give us important information for planning future experiments of regeneration *in vitro* culture.

1. INTRODUCCIÓN

Muchos frutos tropicales han sido domesticados por varios años, los cultivos antiguos y modernos de frutales tropicales han derivado de semillas que resultan de polinizaciones no controladas. Las cualidades hortícolas de cultivos seleccionados generalmente se pierden durante la reproducción sexual y los métodos tradicionales de propagación vegetativa se enfrentan a problemas como el bajo número de enraizamiento de estacas, lento crecimiento y en algunos casos la fácil diseminación de enfermedades. Por otro lado las técnicas biotecnológicas tienen el potencial para proveer métodos eficientes de micropropagación, mejoramiento genético, almacenamiento y conservación de germoplasma, selección y propagación de genotipos económicamente importantes y obtención de metabolitos secundarios (Dodds y Roberts, 1995) .

Sin embargo, el más serio impedimento para la aplicación de estas técnicas en todo su potencial, es la falta de procedimientos de regeneración *in vitro* de plantas completas (Litz *et al.*, 1998).

El mamey [*Pouteria sapota* (Jacq) H. E. Moore & Stearn] es una especie que generaría grandes beneficios económicos si se lograran regenerar plantas completas por cultivo de tejidos. El mamey se encuentra en México en poblaciones silvestres y cultivos comerciales. Sin embargo las poblaciones silvestres son poco aprovechadas por los habitantes de las zonas, a pesar de que podría ser un recurso generador de grandes ingresos económicos, ya que es considerado una de las frutas tropicales exóticas más caras del mercado. En las huertas comerciales su manejo y explotación sigue prácticas tradicionales poco tecnificadas. Por otra parte, el desarrollo del fruto de mamey ocupa alrededor de 20 meses desde el desarrollo de la flor hasta el fruto maduro, condición que dificulta los procesos de mejoramiento de genotipos a corto plazo.

Muchos factores pueden afectar el éxito en el cultivo *in vitro* de cualquier especie. La naturaleza del explante y la época del año pueden influir en el éxito de

la iniciación de los cultivos (Purohit *et al.*, 1994). La regeneración *in vitro* a partir de explantes maduros en especies leñosas es más difícil que a partir de tejido juvenil (Litz, 1986). La selección del explante óptimo para la obtención de tejido morfogénético es crucial para el desarrollo de un protocolo de regeneración exitoso, sin embargo, esta selección requiere de múltiples ensayos experimentales que permitan evaluar las respuestas morfogénéticas del tejido probado, pues se sabe que diferentes partes de una misma planta contienen un estatus fisiológico que resulta en una respuesta muy diferente al ser estimulada por agentes externos (Ziv, 1999).

El principal problema en la regeneración de plantas *in vitro* es, en muchos casos, la falta de información disponible que nos permita la manipulación de las condiciones de cultivo que induzcan esta secuencia de eventos y nos permitan la expresión morfogénética *in vitro*. Sin embargo, la información de la secuencia exacta de eventos a nivel celular y subcelular, o el por qué algunos eventos específicos toman lugar durante la morfogénesis en cultivo es muy somera y limitada (Ziv, 1999).

Este trabajo tiene por objeto explorar el potencial morfogénético de distintas estructuras del mamey que permitan establecer en un tiempo corto, bases para la regeneración de plantas completas de *Pouteria sapota* y así facilitar la selección de genotipos con características comercialmente deseadas. Esto potenciaría el aprovechamiento comercial sustentable de este recurso.

22. ANTECEDENTES

2.1 Ubicación Taxonómica.

El mamey *Pouteria sapota* pertenece a la subclase Simpetalae; Orden Ericales y a la Familia Sapotaceae, la cual incluye 53 géneros y 1100 especies de árboles perennifolios, algunos arbustos y raramente plantas trepadoras (Pennington, 1990).

Clasificación según Judd y colaboradores (2002)

División: Embryophyta siphonogama

Subdivisión: Angiosperma

Clase: Eudicots

Subclase: Simpetalae

Orden: Ericales

Suborden: Sapotineae

Familia: Sapotaceae

Género: *Pouteria*

Especie: *Pouteria sapota* (Jacq) H. E. Moore & Stearn

2.2 Generalidades de *Pouteria sapota* [(Jacq) H. E. Moore & Stearn]

Pouteria sapota es conocido como “zapote mamey” o simplemente mamey. El árbol mide de 20 hasta 40 m de altura, tiene un tronco central erecto con ramificación simpódica y es de lento crecimiento (Figura 1A), tiene una corteza gruesa de 1 a 2 cm de espesor, todo el individuo cuenta con canales laticíferos y su corteza se caracteriza por presentar un profundo olor a almendra, su follaje presenta ramas de crecimiento terminal gruesas de color marrón y posee hojas en abundancia. Las hojas son simples, coriáceas, dispuestas en espiral y casi siempre aglomeradas en la punta de las ramas (Figura 1B), láminas oblanceoladas y a veces ligeramente falcadas de un color verde oscuro en el haz y pálido en el envés, con nervaduras

pinadas y prominentes en el envés, con algunos tricomas simples en la nervadura central: nervaduras laterales casi perpendiculares a la nervadura central y prominentes en el envés; los pecíolos son glabros o pubescentes. Hojas ovadas o lanceoladas agrupadas en ramas terminales. Las ramas tiernas están cubiertas de un vello pardo-rojizo y presentan cicatrices que dejan las hojas al caer (Almeyda y Martín, 1979).

Las flores son hermafroditas y aglomeradas en las axilas de las hojas senescentes. El pedúnculo es muy corto y actinomorfo. Cáliz persistente, constituido de 10 a 12 sépalos blanquecinos, escamosos, pubescentes en la cara externa, dispuestos en 4 series imbricadas formando grupos de 3 a 4 (Romero, 2005). La corola es blanco-amarillenta, gamopétala de 7-8 mm de largo, tubular en la parte inferior, con 4 o 5 lóbulos.

El ovario es pubescente, de color brillante, pentalocular, en cada lóculo lleva un sólo óvulo, de los 5 óvulos solamente se desarrolla 1 y a veces 2, el estilo es corto y el estigma pentalobulado. Los estambres son más cortos que los pétalos, 5 son fértiles, opuestos y adheridos a los pétalos y 5 estambres son estériles y alternos; las anteras son dorsifijas, cordiformes y con una dehiscencia longitudinal

El árbol florece todo el año pero la duración de la apertura floral varía con la estación durante los meses fríos de invierno, cuando el promedio de temperaturas máximas y mínimas son de 22.7 y 7.2 °C respectivamente, las flores permanecen abiertas más de seis días, sin embargo, en primavera las flores sólo permanecen abiertas 3 días y menos de un día durante el verano, cuando el promedio máximo y mínimo de la temperatura es de 33.3 y 22.8 °C respectivamente. Sin embargo la retención de flores en el árbol se observa mucho más alta en verano que en primavera e invierno (Davenport y O'Neal, 2000).

El fruto es de elongado a elipsoide o esférico (Figura 1D) y pesa normalmente alrededor de 0.5 kg. La cubierta es dura rugosa y quebradiza y de color rojizo. El mesocarpo varía en color y textura, puede encontrarse roja, anaranjada o amarillenta, es aromática, dulce y suave, y generalmente contiene fibras

dependiendo del cultivo. El fruto contiene una o más semillas con forma elongada o elipsoide y extremos agudos, color café oscuro brillante con un conspicuo hilio dorsal, color blanco o crema en la parte ventral (Figura 1D). Las semillas germinan entre los 40 a 70 días (Morera, 1994).

El área de distribución del mamey en México presenta una gran variabilidad debido a que es una especie de amplia adaptabilidad. El área más probable de dispersión original se ubica en Guatemala, Honduras, Costa Rica y el Sur de México que comprende el Sur de Veracruz, Tabasco y el Norte y oriente de Chiapas (Pennington y Sarukhan, 1998).

La demanda internacional del fruto ha favorecido que actualmente se encuentre prosperando fuera de su área original, por lo que se pueden encontrar pequeñas plantaciones o árboles aislados en Cuba, Colombia, Ecuador, Jamaica, Filipinas, Estados Unidos y Venezuela (Morera, 1994; Nava-Cruz y Ricker, 2004).

El mamey sapote se adapta bien a nivel del mar y hasta los 1400 msnm. Entre las características del suelo que pueden influir en el desarrollo del mamey están: la calidad de drenado, profundidad, grado de acidez, fertilidad y permeabilidad moderada. Estas características se encuentran principalmente en suelos de áreas tropicales (Morera, 1994). Su temperatura ideal varía entre 25 y 30 °C, esta especie no tolera bajas temperaturas aún durante periodos cortos (Morera, 1994).



Figura 1. Generalidades de *Pouteria sapota*. **A)** Árbol de mamey en Coatlán del Río, Morelos; **B)** Ápice de plántula de Coatlán del Río, Morelos; **C)** Flores y fruto inmaduro; **D)** Fruto y semilla maduros de mamey, **E)** Comercio local de mamey en la ciudad de México.

2.3 Importancia económica

El fruto del mamey es considerado exótico, por lo que tiene un valor alto en el mercado (Figura 1E), el cultivo de esta especie comienza a tener la demanda del mercado externo y podría jugar un importante papel como fuente de ingresos y en el equilibrio de una alimentación adecuada, particularmente para poblaciones rurales y urbanas de bajos recursos (Tabla 1) (Morera, 1994).

La semilla del mamey es aprovechada al extraerse de ella aceites que son utilizados en la industria de cosméticos (Takaeda *et al.*, 1997 citado en Nava-Cruz y Ricker, 2004). En Trinidad y Tobago las semillas son usadas para el control de ectoparásitos en perros. Sin embargo, a pesar de sus propiedades comerciales, el mamey mexicano ha sido subexplotado por los pobladores de las regiones en donde crece en forma nativa (Nava-Cruz y Ricker, 2004).

Tabla 1. Calidad química nutritiva del fruto del mamey según Morera (1994)

100g peso fresco	mg
Proteína	1700
Grasa	400
Carbohidratos	3110
Fibra	2000
Ceniza	1200
Calcio	40
Fósforo	28
Hierro	1
Vitamina A	115
Tiamina	0.01
Riboflavina	0.02
Niacina	2
Acido ascórbico	22

El aprovechamiento de las poblaciones silvestres y el cultivo conjunto de genotipos comerciales en una misma región enriquecería considerablemente tanto ecológica como económicamente a las comunidades locales. Pues proveería a los pobladores del aprovechamiento de un recurso de gran valor económico y mantendría la diversidad genética de las poblaciones silvestres Morera (1994), Ricker y Daily (1998), Ricker *et al* (1999) y Navar- Cruz y Ricker (2004).

2.4 Propagación tradicional de *Pouteria sapota*

El mamey sapote es un cultivo menor con creciente interés en los últimos años. Los estudios sobre esta especie son escasos y las investigaciones existentes hasta el momento se han enfocado a buscar diferentes métodos de propagación vegetativa tradicional (estacas e injertos) y estudios post cosecha. Existen también algunos reportes de los usos tradicionales principalmente referentes al fruto.

Hay una gran deficiencia en el conocimiento biológico general de esta especie y en general de la familia Sapotaceae. La Universidad de Florida publicó en los últimos 10 años, la mayor parte de los trabajos sobre el mamey, enfocados en su propagación vegetativa, los estudios se realizaron en las diferentes selecciones locales importadas principalmente de Cuba, Puerto Rico, El Salvador y Belice (Campbell y Lara, 1992).

La mayoría de los trabajos hechos sobre esta especie se enfocan a métodos de propagación, ya que al ser un árbol de lento crecimiento, se dificulta la posibilidad de hacer selecciones por semilla que cumplan con las características de uniformidad y calidad de fruto que demanda el mercado.

La mayor parte de las plantas cultivadas de mamey se propagan por semilla, sin embargo, al involucrar la reproducción sexual, las plantas generadas son altamente variables así como los frutos que producen. A esto se suma que el tiempo de maduración del árbol desde semilla es muy largo, por lo que la selección se hace aún más lenta y costosa (Campbell y Lara, 1982, Campbell y Lara, 1992). La semilla no tolera desecación, ésta tiene que sembrarse dentro de los 4 o 5 días después de removerlas del fruto ya que pierden viabilidad. A la fecha, no se conoce ningún método efectivo de almacenamiento de semillas en esta especie (Campbell y Lara, 1992).

Por otro lado, se han desarrollado métodos de propagación vegetativa que también presentan fuertes inconvenientes. La propagación por esquejes se ve limitada por el bajo porcentaje de enraizamiento. Se señala que esta falta de enraizamiento se debe a la presencia de fibras en la corteza generando una barrera

física para la formación de la raíz (Campbell y Lara, 1992). Ramsundar y Khader (1986), informaron que lograron el enraizamiento con tratamientos de ácido indolbutírico (AIB) en concentraciones de 1000 a 2000 ppm, en esquejes de ramas jóvenes que previamente habían sido etioladas y anilladas. Este reporte no hace mención del nombre científico de la especie trabajada y se refieren a ella como "sapota", lo cual podría prestarse a confusión y tratarse de otra especie de la misma familia, pues existen varios sinónimos en los nombres comunes de sapotáceas, principalmente entre *Pouteria sapota* y *Manilkara zapota*.

El método que ha resultado más efectivo para la propagación del mamey es la propagación por injertos, el cual ha funcionado en varias especies tropicales leñosas. El éxito de este método depende en gran medida de las condiciones ambientales y fisiológicas tanto del injerto como del porta injerto. El principal problema con este método de propagación es que *Pouteria sapota* es una especie con alto contenido de canales laticíferos, la exudación de látex ante heridas físicas es abundante (Fahn, 1979). El látex que conducen estos canales queda libre al hacer los cortes para el injerto, ello provoca un bloqueo físico inicial entre los tejidos meristemáticos de injerto y porta injero, posteriormente, quizá algunas reacciones bioquímicas de los componentes del látex (fenoles probablemente), oxiden tejidos y sean una causa adicional en las fallas de la sobrevivencia del injerto. Por estas razones es necesario que se retire completamente el látex tanto del injerto como del portainjerto, para que se de la unión de los haces vasculares (Salcedo, 1985)

Por otro lado Ogden (1984) reportó que, el alto contenido de sílice en el tejido cortical de tallo, es una de las características que impide que la propagación por injertos sea exitosa al 100% esto, adicionado a que el éxito del injertado depende también en grán medida, de la época del año en la que se lleve a cabo. Morera (1994) coicíde con Ogden y propone que la mejor época para la propagación por injertos es durante el verano, cuando el árbol se ecuentra totalmente defoliado periodo en el cual el individuo se encuentra en dormancia.

2.5 Cultivo de Tejidos Vegetales

Todo tipo de reproducción sexual comienza con la formación de gametos y su unión en una sola célula llamada cigoto, el cual por continuas divisiones celulares da lugar al cuerpo complejo de un organismo maduro. Como las divisiones involucradas en ello son mitóticas, cada célula en el cuerpo de un organismo debe tener el mismo material genético que el cigoto. Haberlandt introdujo el concepto de totipotencialidad celular y sugirió que cualquier célula de estructuras diferenciadas, al contener el número normal de cromosomas, deben de ser capaces de regenerar plantas completas. Esta hipótesis fue probada posteriormente en 1939 con las investigaciones independientes de Gautheret, Nobecourt y White (citado en Soh y Bhojwani, 1999).

Se ha tenido un gran progreso en el cultivo de células, tejidos y órganos en un medio artificial bajo condiciones controladas, lo cual ha dado lugar a diversas técnicas asépticas llamadas colectivamente “Cultivo de tejidos vegetales”.

Estas técnicas de laboratorio han probado ser una poderosa herramienta para la obtención de la morfogénesis y para entender el papel de varios factores extrínsecos y efectos correlativos de los diferentes tejidos durante la morfogénesis. El valor de la morfogénesis *in vitro* ha trascendido a un procedimiento viable comercialmente para la propagación de plantas y un paso esencial para el mejoramiento genético en cultivos importantes a través de los métodos biotecnológicos modernos, que han sido considerablemente promovidos en la investigación de los países desarrollados (Soh y Bhojwani, 1999).

La regeneración *in vitro* de diferentes especies tropicales se ha logrado exitosamente en especies frutales como el plátano (Balbão *et al.*, 2001), papaya (Litz y Conover, 1983) chirimoya (Rasai *et al.*, 1995), limón (Gosal *et al.*, 1995), mango (Litz *et al.*, 1995), y durazno (Scorza, 1990).

El número de árboles frutales propagados por estas técnicas se ha incrementado en últimas fechas, ya que por estos métodos la talla y rango de

crecimiento pueden ser controlados, permitiendo el cultivo de éstos en espacios más reducidos y condiciones controladas (George y Sherrington, 1988).

Entre las ventajas que el cultivo de tejidos ofrece a la industria de horticultura están (Hutchinson, 1981; Bonga y Von Aderkas, 1992; Rangan, 1993):

- Generación de nuevas variedades así como la propagación masiva de especies y cultivos, principalmente aquellos en donde la talla y vigor de los árboles son un problema.
- Erradicación de virus y enfermedades tipo virales por medio del cultivo de meristemos, nucela o endospermo.
- Reducción del tiempo entre la sobrevivencia de una estaca nueva y la cosecha.

Las respuestas morfogenéticas o de diferenciación de las células, que permiten regenerar plantas completas son básicamente tres: a) el desarrollo de yemas preformadas (meristemos); b) organogénesis o formación de órganos, principalmente de brotes; c) embriogénesis somática o formación de embriones adventicios (George, 1993; Dodds y Roberts, 1995).

A través de estas vías ha sido posible propagar de manera masiva, uniforme (clonal), libre de patógenos, en un espacio reducido y en un corto tiempo a muchas especies de interés agronómico, hortícola y forestal como es el caso de la fresa y frambuesa (Graham y McNicol, 1990), el kiwi (Mitrofanova y Mitrofanova, 2000), el prunus y pistache (Durzan, 1990) por mencionar sólo algunos.

Se considera que en el mundo se producen *in vitro* más de 500 millones de plantas, que posteriormente son manejadas de manera convencional en suelo, con una aclimatización previa (George, 1993; Fay, 1994).

La respuesta morfogenética preferente en la regeneración de cualquier especie es la embriogénesis somática, ya que es un proceso de producción de estructuras bipolares, capaces de germinar sin pasar por las fases separadas de inducción de brotes y raíz (Dunstan *et al.*, 1995). La inducción de raíz en los brotes generados por organogénesis es, actualmente, uno de los impedimentos más comunes en el

desarrollo de una metodología eficiente para micropropagar diferentes especies (principalmente en gimnospermas).

Con la inducción de embriogénesis somática los embriones regenerados se inducen a su madurez y germinación con balances de reguladores de crecimiento, y las plántulas regeneradas pueden ser trasplantadas al suelo, además ofrece la posibilidad de nuevos estudios para generar semilla artificial de calidad controlada y garantizada (Nieves *et al.* 1998).

2.5.1 Cultivo de Tejidos en especies frutales

Dado que la propagación de plantas por cultivo de tejidos resulta en la multiplicación clonal de individuos, es importante tomar algunas consideraciones antes de decidir la propagación clonal de una especie (Bonga y Von Aderkas, 1992).

- 1) Los clones son generalmente exitosos en sitios específicos por lo que podrían tener éxito solamente en sitios con condiciones ambientales similares a las de la planta madre.
- 2) La uniformidad genética puede causar daños poblacionales (endogamia)
- 3) Los clones obtenidos por micropropagación pueden no ser copias exactas (variación somaclonal) y
- 4) Algunos genotipos pueden ser clonados fácilmente mientras otros, pueden ser de difícil multiplicación clonal.

La regeneración de especies frutales puede ser inducida a partir de diferentes explantes: yemas vegetativas, cotiledones, fragmentos de hoja, segmentos de brotes laterales y embriones (Tabla 2). Usados en el proceso de domesticación, los cuatro métodos de micropropagación 1) activación de meristemas, 2) embriogénesis somática, 3) organogénesis, 4) cultivos de embriones, permiten no sólo la

propagación de plantas, sino la creación de nuevas formas y la conservación de genotipos importantes económicamente (Tabla 2).

Embriogénesis somática en especies leñosas tropicales

Los cultivos embriogénicos de especies tropicales y subtropicales han sido utilizados para la propagación *in vitro* de variedades seleccionadas que tienen resistencia a factores de estrés biótico y abiótico, además de permitir estudios con el aislamiento y cultivo de protoplastos, transformación genética y para el almacenamiento del germoplasma vegetal (Litz *et al.*, 1998)

Se ha reportado en diferentes especies la embriogénesis somática a partir de diversos explantes como: hojas, nudos, entrenudos, cotiledones, meristemos apicales, secciones florales, nucela y gametofitos masculinos y femeninos (Tabla 2).

El explante es uno de los factores que más influye en el desarrollo de un tejido embriogénico, los explantes más utilizados, cuando se quiere inducir tejido embriogénico son; estructuras juveniles en desarrollo como embriones zigóticos, epicótilos y cotiledones de plántulas recién germinadas. La utilidad de los explantes juveniles para la propagación clonal verdadera es más limitada para especies que tienen fases juveniles largas, ya que esto retarda el proceso de selección, sin embargo, para este tipo de especies existen estrategias para el almacenamiento de embriones somáticos en cultivo -por ejemplo en gimnospermas- los cuales sirven de base para mantener los cultivos madre durante la evaluación clonal de plántulas derivadas de esos embriones (Dunstan *et al.*, 1995).

No obstante también se ha observado embriogénesis somática con explantes tomados de plantas adultas, como son, partes de hojas y segmentos de brotes. En la palma *Elaeis guineensis* se desarrolló callo embriogénico a partir del tejido perivascular de la nervadura de hoja (Schwendiman *et al.*, 1988). Otro ejemplo importante es la obtención de tejido embriogénico a partir de las hojas de individuos maduros de *Ceratozamia euryphyllidia* (Chávez *et al.*, 1998), *C. mexicana* (Chávez *et al.*, 1995).

Tabla 2. Embriogénesis somática en diferentes especies de árboles frutales tropicales.

Especie	Explante	Medio de cultivo	Reguladores del crecimiento	Referencia
<i>Ananas comosus</i>	Yemas axilares	MS	Establecimiento: BA 1 mg/l; multiplicación ANA 5.4 mg/l; AIA 5.2mg/l; K 2.1 mg/l	Guzmán, (1990)
<i>Carica papaya</i>	Cotiledones, lámina,	Ms ½ sales y Fe + 30 g sacarosa	BA 0.3 – 2 mg/l + ANA 0.5- 3mg/l- 1.2-5mg/l ANA	Litz <i>et al.</i> , (1983)
<i>Carica papaya</i>	Óvulo fecundado	MS ½ sales y Fe+ 20% v/v agua de coco, 400mg/l glutamina, 60g sacarosa.	Sin reguladores para regenerar callo, con 1-2mg/l 2,4-D para inducir embriogénesis Todo en medio líquido	Litz y Conover, (1983)
<i>Theobroma cacao L.</i>	Embrión zigótico. tejido nucelar,	MS basal + hidrolizado de caseína+ agua de coco 10% ½ sales MS líquido+ 10% agua de coco, extracto de malta, HC 0.2% PVP	2,4-D, ANA o AIA 4 µm 2,4-D, 0.5µM 2 iP, agua de coco	Figueira y Janick, (1995)
<i>Cocos nucifera</i>	Hojas jóvenes, plúmula	No reportado	100 µM 2, 4-D	Blake y Hornung, (1995)
<i>Mangifera indica L.</i>	Nucela y cotiledones	Macronutrientes de B5, Micronutrientes y comp. Org. de MS, 400mg/l glutamina, 60 g/l sac y 2 g/l gellan	4.5 µM de 2,4-D	Litz <i>et al.</i> , (1995)
<i>Citrus spp.</i>	Tejido ovular y nucelar	Medio MS y MT frecuentemente adicionado con agua de coco, jugo de naranja, caseína hidrolizada y extracto de malta	Diferentes combinaciones de BA, AIA, Zeatina, kinetina, 2,4-D	Gosal <i>et al.</i> , (1995)
<i>Manilkara sapota</i> (<i>Achras sapota</i>)	Hoja, cotiledones, embriones, endospermo	Medio basal Nitsch's + agua de coco (15%), o medio CDK	2,4-D (4ppm) + K (2ppm)	Sachdeva, y Mehra, (1986)

El papel de las auxinas en la embriogénesis somática

Para la mayoría de los protocolos de inducción de embriogénesis somática, el requerimiento absoluto ha sido la adición exógena de auxina al medio de cultivo, para posteriormente transferir el tejido ya embriogénico a un medio con nula o muy bajas concentraciones de auxinas (Thorpe y Stasolla, 2001).

La importancia de las auxinas en la embriogénesis somática radica en que:

- Estimulan la rápida división celular.
- Estimulan una división celular adecuada que produce células pro-embriogénicas y
- Estimula la proliferación de células pro-embriogénicas que darán origen a tejido embriogénico.

El regulador más utilizado es el ácido 2-4-diclorofenoxiacético (2, 4-D), el ácido naftalenacético (ANA) tiene un uso menos frecuente (Litz *et al.*, 1998, Chávez *et al.*, 1998; Litz, 1988). Se estima que en el 50% de los casos se han utilizado bajas concentraciones de auxinas (0.5-5 μ M) (Biahoua y Bonneau, 1999). En casos más particulares se han empleado las combinaciones de otro tipo de reguladores como el ácido abscísico, zeatina, ácido giberélico y la isopentenil adenina (2iP) (Dodds y Roberts, 1995).

Otro componente del medio de cultivo que juega un papel importante es el nitrógeno inorgánico, sin embargo se ha observado que altas concentraciones de NH_4^+ como fuente de nitrógeno pueden ser inhibitorias de la embriogénesis somática. Además de compuestos inorgánicos como el NH_4Cl se utilizan aminoácidos como fuente de nitrógeno (adenina, glutamina, alanina, prolina y serina). Estos requerimientos tan altos de nitrógeno pueden ser un reflejo de la síntesis continua de proteínas, ácidos nucleicos y sustancias de reserva (Merkle *et al.*, 1995).

Entre las especies frutales leñosas que ya se propagan por embriogénesis somática *in vitro* se encuentran: *Citrus microcarpa*, *C. grandis*, *C. reticulata* (Rangaswamy, 1981), *Carica papaya* (Litz y Conover, 1983), *Theobroma cacao* (Figueira

y Janick, 1995), *Passiflora edulis* var. *Flavicarpa* (Casarrubias *et al.*, 2001), *Mangifera indica* L (Manzanilla-Ramírez,2001), y se tienen más de dos protocolos para propagar diferentes especies de los géneros de gran importancia económica como *Malus* spp., *Pyrus* spp. y *Prunus* spp. (Hutchinson, 1981)

Organogénesis en especies leñosas tropicales

Un gran número de los trabajos realizados en especies frutales o maderables describen métodos de regeneración a partir de embriones o tejidos de plántula, sin embargo en pocos trabajos se tienen logros con explantes de árboles élite maduros con los cuales, cualquier método de propagación clonal sería de gran utilidad (Mascarenhas *et al.*, 1981).

En general el método de propagación más utilizado para árboles frutales es la inducción de brotes múltiples. Los explantes utilizados para organogénesis son hojas, yemas laterales o terminales que son superficialmente esterilizadas y sembradas en medios ricos en sales y compuestos orgánicos, adicionados con citocininas (generalmente Bencíl aminopurina (BAP) y cinetina (K) son las más empleadas), con o sin auxina, una vez establecidos los cultivos, las raíces adventicias pueden ser iniciadas en cualquier momento, generalmente este último paso requiere combinaciones factoriales de auxinas que promuevan la formación de raíz, comúnmente se han utilizado para el enraizamiento de estas especies AIA, ANA y ácido indolbutírico (AIB). Las especies que han sido propagadas exitosamente por organogénesis llegan a la maduración en tiempos más cortos y con las cualidades comerciales con las que fueron seleccionadas para la propagación clonal. Ejemplos de especies comerciales cultivadas por este método son detallados en la tabla 3.

En árboles tropicales, la propagación *in vitro* ha sido restringida a la multiplicación de brotes axilares (Mascarenhas *et al.*, 1993; Bonal y Monteuis, 1997; Tiwari *et al.*, 2002) los estudios con marcadores genéticos indican que este método tiene una alta fidelidad clonal (Gangopadhyay *et al.*, 2003).

Tabla 3. Especies de frutales propagadas por organogénesis.

Espece	Explante	Reguladores del crecimiento	Medio de cultivo	Referencia
<i>Baccaurea motleyana</i>	Semillas	ANA 5mg l ⁻¹ /K 2.5-5mg l ⁻¹	MS	Rao <i>et al.</i> (1982)
<i>Actinidia deliciosa</i>	Yemas laterales	BAP (2.22 µM)	MS	Mitrofanova y Mitrofanova (2000)
<i>Malus x domestica</i>	Hoja	BAP (concentración no especificada)	PM y LS (Linsmaier y Skoog, 1965.	Fasolo y Predieri (1990)
<i>Diospyrus kaki</i>	Yemas	BAP (0.08-8.9µM l ⁻¹) Zeatin (0.91-4.56 µM l ⁻¹)	MS	Mitrofanova y Mitrofanova (2000)
<i>Crataegus pinnatifida</i>	Yemas laterales Embriones maduros	ANA (0.5mg l ⁻¹) BAP (2mg l ⁻¹)	MS	Yu <i>et al.</i> (1982) Wang y Gao 1982 citado en Wang <i>et al.</i> (1988)
<i>Ribes nigrum</i>	Embriones Yemas laterales	BAP (3mg l ⁻¹) (1.5mg l ⁻¹)	GA ₃ MS	Huang <i>et al.</i> (1983) Wang <i>et al.</i> (1988)

2.5.2 Cultivo de Tejidos en la familia Sapotaceae

Para *Pouteria sapota* no se han reportado protocolos de regeneración por cultivo de tejidos, se han hecho estudios en la Universidad de Florida pero han encontrado una severa dificultad para obtener la formación de callo y formación de tejido diferenciado a partir de él, por lo que no se ha dado ni la embriogénesis ni la organogénesis (Campbell y Lara, 1992).

Hasta la fecha sólo se encuentran en la literatura tres estudios de regeneración por cultivo de tejidos en especies de la familia Sapotaceae. En el primero de ellos

Sachdeva y Mehra (1986), lograron la formación de callo y etapas tempranas de la formación de embriones somáticos en *Manilkara zapota* (*Achras sapota*). En este estudio se utilizaron como explantes, hojas, embriones, cotiledones y endospermo en medio basal Nitsch's (BN) adicionado con agua de coco, 2,4-D (4ppm), cinetina (2ppm). Con esta combinación lograron la inducción de callo blanco amarillento, además observaron que el endospermo de semillas en germinación es más regenerativo para callo y que los mejores explantes para esta especie fueron a partir de los cotiledones y el hipocótilo. La embriogénesis somática que los autores lograron fue típica que en algunos casos se origina de una célula aislada del resto del callo y en otros casos fué atípica, en donde una masa de células del callo pasan por una serie de divisiones para formar estructuras irregulares ovoides o globulares del cual se desarrolla un ápice de brote, cotiledones y en el extremo final una raíz. Además obtuvieron "nódulos embrioidales" directamente de la superficie del explante.

Jordan y Ayanedel (1992), reportaron la regeneración *in vitro* de *Pouteria lucuma* partiendo de plántulas de 3 años de edad. El establecimiento aséptico de los explantes (ápices de brotes, meristemos, hojas, raíces, pericarpos y epicótilos) fué logrado mediante la incubación por 5 h en una solución con antibióticos, fungicidas y ácido ascórbico. Probaron los medios de cultivo: Murashige y Skoog (1962), Anderson (1980), Nitsch y Nitsch (1969), Lloyd y McCown (1981) y White (1963) con diferentes combinaciones de los reguladores del crecimiento: zeatina, BAP, kinetina, Ácido naftalen acético (ANA), giberelina (GA_3) y Tidiazuron. Además de esto, adicionaron a cada uno de los medios probados los siguientes componentes: caseína hidrolizada, glutamina, agua de coco, sulfato de adenina, polivinilpirrolidona (PVP) y polivinilpolipirrolidona (PVPP), los dos últimos para evitar el oscurecimiento del tejido por compuestos fenólicos. Entre los resultados más importantes que los autores obtuvieron están; la regeneración directa e indirecta de brotes y raíces en peciolo de hojas en medio MS adicionado con zeatina, ANA ó GA_3 ; la formación de brotes adventicios a partir de embriones en medio MS adicionado con agua de coco

y PVP y por último la formación de callo organogénico a partir de meristemas en medio MS adicionado con zeatina y ANA. Los autores concluyen que el mejor explante para la regeneración es el ápice de brote de individuos juveniles y señalan que no obtuvieron resultados de regeneración de explantes de individuos adultos.

En un tercer trabajo publicado por Purohit y Singhvi en 1998 reportaron la micropropagación por organogénesis directa de *Achras sapota* en medio SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) suplementado con 2.0 mg/l de BAP. La respuesta morfogénica se expresó en 42 días a partir de segmentos nodales de plántulas germinadas *in vitro* utilizadas como explante. Después del establecimiento e iniciación de brotes agregaron GA₃ durante el primer subcultivo, ésto mejoró la elongación de los brotes. El enraizamiento de estos brotes se realizó con pulsos de 200 mg/l de AIB durante 2 h trasplantando posteriormente en suelo esterilizado. Los autores reportan el 70-80% de enraizamiento y el 90% de establecimiento exitoso en suelo para esta sapotacea. El inconveniente de este trabajo fué que el éxito real depende completamente del éxito en el enraizamiento funcional de los brotes generados (Purohit y Singhvi, 1998).

Pese a los trabajos realizados y mencionados anteriormente con otras especies de la familia, los protocolos aún están en un nivel experimental y ninguno se ha probado para la regeneración de plantas a mayor escala, además los tipos de explantes utilizados en estos protocolos no son los ideales para la selección de genotipos, pues utilizan explantes que provienen de plantulas o semillas germinadas *in vitro*, en donde esta ya involucrada la reproducción sexual y no se sabe el tipo de cualidades comerciales que pueden expresarse al llegar a un estado adulto.

Ningún trabajo en estas especies ha logrado la regeneración *in vitro* a partir de estructuras de árboles maduros, aún cuando este tipo de explantes son los ideales para la selección de genotipos, dado que en árboles maduros ya se tienen caracterizadas las cualidades fenotípicas del fruto, propias para su comercialización.

Como se mencionó anteriormente no hay reportes de regeneración *in vitro* de *Pouteria sapota*. El desarrollo de un método eficiente para la propagación por cultivo

de tejidos de esta especie, brindaría la oportunidad de hacer estudios más precisos sobre su fisiología, manejo, selección y propagación de genotipos con características importantes, así como la posibilidad de llevar a cabo mejoramiento genético en esta especie de importancia biológica y comercial, que podría ser una fuente importante de ingresos a nivel regional y nacional.

3. JUSTIFICACIÓN

Pouteria sapota (mamey) es una especie tropical de importancia ecológica y de interés comercial por sus frutos, la restricción en su distribución, su ciclo de vida largo, la falta de industrialización, pero sobre todo, la variabilidad de la calidad del fruto, lo convierten en uno de los frutos más caros del mercado nacional, sin tomar en cuenta los usos regionales e industriales que tiene la semilla.

Las técnicas tradicionales de propagación vegetativa son limitadas y no permiten la selección de genotipos a corto plazo. Por lo tanto el presente trabajo tiene como objetivo explorar el potencial morfogenético *in vitro* de diferentes estructuras del árbol de mamey que permitan establecer las bases para la regeneración de plantas completas, y con ello, la posibilidad de desarrollar un método de regeneración por cultivo de tejidos para la especie *Pouteria sapota* con la finalidad de ofrecer una nueva alternativa en la selección de genotipos con características comerciales.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General.

Estudiar el potencial morfogénético de *Pouteria sapota* para su regeneración *in vitro*.

4.2 Objetivos particulares.

- 1) Determinar el potencial morfogénético *in vitro* de estructuras diferenciadas como hojas, así como también de semillas inmaduras (embriones y endospermo).
- 2) Determinar el método de desinfección de cada uno de los explantes utilizados que hagan posible su cultivo aséptico *in vitro*.
- 3) Establecer las condiciones de cultivo para la regeneración *in vitro* de esta especie (Medio de cultivo y condiciones abióticas) y determinar el mejor explante con base en sus respuestas para la regeneración *in vitro*.
- 4) Describir el efecto promotor de la morfogénesis en los explantes con diversas combinaciones de reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas).
- 5) Determinar el origen histológico de la respuesta morfogénética que se logre inducir así como su descripción histológica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Colecta de material biológico.

El material biológico se colectó durante marzo y abril de 2003 en la huerta comercial de mamey del municipio de Coatlán del Río, Morelos. Se colectaron ramas de árboles adultos, las cuales se trasladaron al laboratorio, en donde se cortaron las primeras hojas jóvenes expandidas y los ápices de tallo. Las ramas colectadas se encontraban en crecimiento activo, las hojas presentaban un color verde claro y textura suave. También se utilizaron hojas jóvenes de plántulas (70 cm a 1 m) tanto de la huerta comercial, como de la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, Veracruz. Se tomaron como explantes hojas jóvenes con una lámina foliar de entre 5 y 8 cm de longitud que no presentaran heridas ni síntomas de parásitos o herbivoría, se cortaron las hojas desde la base del pecíolo y se sometieron al proceso de desinfección.

También se colectaron frutos inmaduros cuyo tamaño fue entre los 3 y 4 cm de diámetro tanto de Coatlán del Río como de la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, Veracruz. Los explantes de los frutos inmaduros (para obtener semillas inmaduras de las que se utilizaron embriones y endospermo), se sembraron entre las 24 y 72 horas después de su colecta, en el transcurso de ese tiempo los frutos se almacenaron en el refrigerador a -7°C , previo a la extracción de las semillas, los frutos completos se lavaron y se sometieron al proceso de desinfección que a continuación se describe.

5.2 Establecimiento de los cultivos *in vitro*.

5.2.1 Desinfección de material biológico.

Hojas.

1.- Para la desinfección de las hojas se realizó un lavado con agua corriente para remover polvo y grasas adheridas al tejido.

2.- Los explantes se sumergieron y agitaron manualmente en una solución jabonosa durante 5 minutos, se enjuagaron con agua corriente para eliminar el jabón y se realizó un último enjuague con agua destilada.

3.- Posteriormente se sumergieron durante 2 minutos con agitación manual en una solución de EtOH al 70% preparada con agua destilada y después se probaron los siguientes desinfectantes:

- a) Cloro comercial Cloralex (Hipoclorito de sodio, 6% de cloro libre) al 20% v/v durante 20-25 min.
- b) Peróxido de hidrógeno (solución comercial farmacéutica) al 20% durante 20-25 min (Bonga y Von Aderkas, 1992).

Transcurridos los 20 o 25 minutos se realizaron tres enjuagues en agua destilada esterilizada y con ayuda de una campana de flujo laminar y 2 mecheros bunsen para generar las condiciones asépticas, se realizó la siembra del tejido.

Las hojas ya desinfectadas se cortaron en secciones transversales, se colocó un segmento de 1-2 cm por frasco. A cada sección de hoja se le consideró un explante. Inicialmente se sembraron 10 explantes por frasco, sin embargo la desinfección no se logró al 100% por lo que los explantes con presencia de contaminación se descartaron. Aquellos que lograron establecerse asépticamente se mantuvieron en observación hasta que se registraron cambios en el explante que denotaran respuesta al tratamiento. Se realizó una réplica con 8 repeticiones asepticas por tratamiento.

Frutos.

Los frutos inmaduros se desinfectaron siguiendo la misma metodología realizada en las hojas a excepción del paso 3 en el cual sólo se aplicó la solución de cloro comercial con los mismos tiempos y concentración, esto debido a que en un ensayo previo se obtuvieron buenos resultados con esta solución. Transcurridos los 20 o 25 minutos de desinfección se procedió a realizar 3 enjuagues en condiciones

asépticas con agua destilada esterilizada, se cortaron a la mitad con ayuda de instrumental de disección y se extrajo la semilla inmadura completa.

Una vez extraída la semilla se cortó la cubierta seminal, se extrajeron el embrión y el endospermo y se realizó la siembra de los explantes en el medio de cultivo, colocando un embrión por frasco. El endospermo se cortó en dos porciones longitudinales y se sembró un fragmento por frasco. De cada tratamiento se hicieron 8 repeticiones. Se hicieron 4 réplicas con un número variable de repeticiones por tratamiento, determinado principalmente por la disponibilidad de material biológico.

5.3 Tratamientos de Inducción Morfogenética

5.3.1 Medios de cultivo.

Para todos los explantes se probaron dos medios de cultivo, el medio Litz y el medio SH. En ambos medios se agregaron 2.5 g/l del adsorbente polivinilpirrolidona (PVP) para evitar la oxidación del tejido por su alta afinidad a sustancias fenólicas (Jordan y Oyanedel, 1992; Jiménez, 2002).

También se adicionó a los medios de cultivo agua de coco al 15% v/v, como lo hicieron Sachdeva y Mehra (1986) para *Manilkara zapota*.

Como fuente de carbono se agregó sacarosa en concentraciones de 30 g/l para el medio SH y 60 g/l para el medio Litz (Schenk y Hildebrandt, 1972; Litz, 1983).

Después de agregar los tratamientos de los reguladores del crecimiento para cada ensayo, el medio se ajustó a pH 5.7 y se agregó gelrite 4 g/l como gelificante en los medios sólidos, en los medios líquidos se utilizó papel filtro como soporte para evitar la inmersión del explante.

Se utilizaron frascos Gerber de 150 ml de capacidad y a cada frasco se le agregaron 25 ml de medio de cultivo tanto en medio sólido como en medio líquido. Todos los medios se esterilizaron durante 17 minutos en una autoclave vertical a 121°C y 1.5 kg/cm² de presión.

5.3.2 Reguladores del crecimiento.

Se utilizaron 2 reguladores del crecimiento; la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y la citocinina 6-bencilaminopurina (BAP). Los dos medios de cultivo se adicionaron con los reguladores del crecimiento en diferentes combinaciones como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Combinación factorial de auxina / citocinina para la inducción morfogénica de tejidos somáticos de *Pouteria sapota*.

		2, 4-D (mg/l)							
		0	0.1	0.2	0.5	1	1.5	2	2.5
B	0	0 / 0	0 / 0.1	0 / 0.2	0 / 0.5	0 / 1	0 / 1.5	0 / 2	0 / 2.5
	0.5	0.5 / 0	0.5 / 1	0.5 / 0.2	0.5 / 0.5	0.5 / 1	0.5 / 1.5	0.5 / 2	0.5 / 2.5
P	1	1 / 0	1 / 0.1	1 / 0.2	1 / 0.5	1 / 1	1 / 1.5	1 / 2	1 / 2.5
	2	2 / 0	2 / 2	2 / 0.2	2 / 0.5	2 / 1	2 / 1.5	2 / 2	2 / 2.5
	3	3 / 0	3 / 0.1	3 / 0.2	3 / 0.5	3 / 1	3 / 1.5	3 / 3	3 / 2.5

Los recuadros resaltados indican los tratamientos usados para endospermos y embriones

5.4 Cultivo de las hojas.

Las hojas desinfectadas se sometieron a los tratamientos con reguladores del crecimiento descritos anteriormente. Los tratamientos con reguladores del crecimiento descritos en el Tabla 4 se aplicaron al medio Litz y SH. Los explantes se incubaron durante 40 días en la oscuridad y se mantuvieron a 25 ± 2 °C en ese medio hasta que se observó algún cambio estructural del tejido. Se sembraron 8 frascos por tratamiento y se realizó una réplica con 8 repeticiones por tratamiento.

5. 5 Cultivo de endospermo.

Los frutos ya desinfectados se midieron con la ayuda de un vernier y se cortaron transversal y longitudinalmente hasta encontrar la ubicación de la semilla, la cual se extrajo. Cuidando de no dañar al embrión, se abrieron los tegumentos y se extrajo el embrión, y de encontrarse ahí también se extrajo el endospermo y se sembraron en los diferentes tratamientos.

Para este tipo de explantes solamente se empleó medio líquido con puentes de papel filtro. Los reguladores del crecimiento empleados fueron los mismos que los usados con hoja, sin embargo, sólo se probaron las combinaciones que se encuentran enmarcadas en el Tabla 4, tanto en medio Litz como en medio SH (Figura 2). Se realizó una réplica de los tratamientos que mostraron una respuesta morfogénica con 8 repeticiones por tratamiento. Los cultivos se incubaron durante 90 días en oscuridad y se mantuvieron a 25 ± 2 °C.

5. 6 Cultivo de embriones.

Los embriones extraídos del endospermo se sembraron también en los mismos tratamientos utilizados para endospermo, se sembró un embrión por frasco y se realizaron 8 repeticiones por tratamiento. Los cultivos se mantuvieron en las mismas condiciones que los experimentos con endospermo (Figura 2).

Los cultivos en inducción líquido y sólido se incubaron durante 90 días en oscuridad y se mantuvieron a 25 ± 2 °C. Los tratamientos se mantuvieron en observación constante y se tomaron los datos referentes para cada tratamiento.

5.6 Microtécnia

El material biológico se fijó en solución FAA 10% [Formaldeído (36-40%), 5% ácido acético glacial, 50% alcohol etílico y 35% agua destilada]. Una vez fijado el material, se deshidrató con propanoles graduales (50%, 70%, 80%, 96%, 100%, 100%) posteriormente se infiltraron los tejidos en tres cambios de xilol al 100% por un periodo de 6 horas en cada cambio. Las muestras se infiltraron en parafina,

posteriormente se colocaron en charolitas de aluminio en donde se orientaron y se dejó solidificar la parafina.

Las muestras ya incluidas se montaron en bloques de madera para ser cortadas con ayuda de un micrótopo rotatorio (Americal Optical Company) se hicieron cortes de 10 μm de grosor que posteriormente fueron adheridos a los porta objetos con adhesivo de cromo (ver anexos). Los cortes se extendieron sobre una plancha a 54 °C donde permanecieron por 48h para asegurar la adhesión al porta objetos. Una vez adheridos, los cortes se desparafinaron en tres cambios de xilol 100% y se rehidrataron en alcoholes graduales (etanol 100%, 96%, 80%, 70% y 50% durante 3 minutos en cada cambio.

Una vez desparafinados los cortes se tiñeron con safranina "O" (0.5% de safranina en alcohol al 50%) durante 2 horas, posteriormente se enjuagaron con agua destilada, se tiñeron a criterio (5-8 seg) con verde rápido (FCF) (0.1% verde en etanol 70%), el exceso de colorante se retiró con un lavado rápido de alcohol isopropílico absoluto. Los cortes una vez teñidos se pasaron a alcohol isopropílico 100% y tres cambios de xilol 100% durante 3 minutos en cada cambio, los cortes se montaron con bálsamo de Canadá y se dejaron secar a 54°C durante por lo menos 48 horas.

Una vez secos los cortes se observaron al microscopio óptico de campo claro, los cortes de interés se capturaron con una cámara digital (Sony Cyber Shot Pro) a una resolución de 3.1 mega píxeles y posteriormente se agregaron las barras a escala.

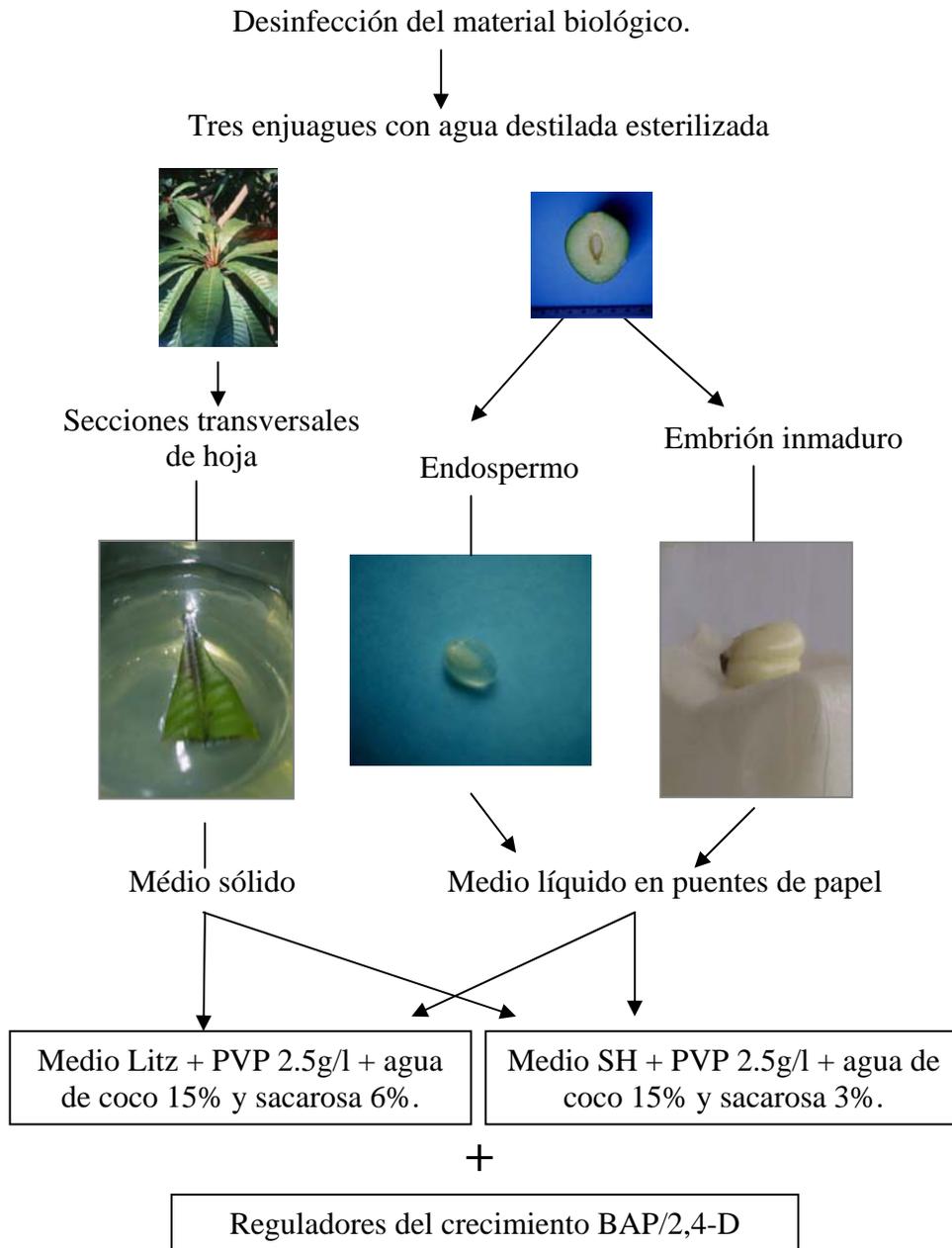


Figura 2. Metodología general para el establecimiento de explantes provenientes de individuos de campo de *Pouteria sapota*.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Establecimiento del cultivo *in vitro*

Para lograr el establecimiento *in vitro*, es necesario realizar una desinfección exitosa del explante utilizado. La etapa de establecimiento de un cultivo *in vitro* es particularmente difícil para especies que poseen pubescencia, tricomas en altas cantidades, ornamentaciones que tornen su superficie irregular. En especies tropicales se suman factores como la alta diversidad microbiológica de su ecosistema, la cual aumenta la posibilidad de fitopatógenos tanto exógenos como endógenos y con ésto, sus posibilidades de resistencia contra el agente desinfectante usado. Este es el caso de *Pouteria sapota* pues es una especie tropical que contiene en la superficie del peciolo y ápices de tallos una alta densidad de pubescencias por lo que en explantes como yemas laterales o ápices de brote la desinfección fue difícil de lograr (datos no mostrados), razón por la cual se descartaron para ser usadas como explantes en este estudio.

La desinfección de las hojas con cloro comercial al 20% v/v resultó ser la más efectiva. El 86.4% de los explantes sembrados se mantuvieron libres de cualquier contaminante y con una apariencia saludable, sin daño visible al tejido después del tratamiento de 20 min. El 13.6% de los explantes sembrados resultaron contaminados principalmente por hongos que se manifestaron entre los 4 a 7 días posteriores a la siembra. Esto se atribuye a que algunas hojas sometidas al tratamiento presentaron pequeñas heridas que sólo se hicieron evidentes después del tratamiento de desinfección pero no eran visibles antes, posiblemente estas heridas eran resultado del comienzo de colonización de algún microorganismo.

El otro desinfectante probado fue el H₂O₂ el cual se sabe que es uno de los compuestos más tóxicos para las células tanto animales como vegetales, y por tal motivo se ha utilizado como desinfectante superficial a diferentes concentraciones

para eliminar microorganismos principalmente en explantes como semillas (Bonga y Von Aderkas, 1992).

En este trabajo la desinfección realizada con peróxido de hidrógeno al 20% presentó una contaminación inicial del 38.7% manifestada entre los primeros 15 días del inicio el cultivo, la contaminación fué causada por hongos y bacterias. El tejido que no se contaminó, posteriormente cambió su color verde por un color café verdoso, probablemente como síntoma de oxidación, y se tornó completamente café oscuro con el paso de los días sin ningún cambio en la textura del tejido, conforme transcurrieron las semanas se fueron manifestando nuevas colonias de hongos y bacterias en los explantes sometidos a este tratamiento. Se ha reportado su uso en diferentes concentraciones que van de 1-3% en tiempos de 10 a 20 min para diversos tipos de explantes (Fay y Gratton, 1992; Alvarado, 1998; Harry y Thorpe, 1999; Jiménez, 1998).

Estos resultados sugieren que la concentración de H_2O_2 utilizada para la desinfección de las hojas fue muy alta y resultó tóxica para el tejido causándole una oxidación severa que lo llevó a la necrosis mortal. Aunque se pensaría que esta concentración eliminaría completamente a los agentes contaminantes, ésto no resultó así, ya que se siguió manifestando la contaminación aún después de 2 semanas de establecido el cultivo y bajo las mismas condiciones que los explantes tratados por el otro método. Esto sugiere que el Peróxido de hidrógeno en esta concentración y en ese tiempo de aplicación, posiblemente no fué capaz de penetrar en estructuras de resistencia como lo son las esporas, por lo que éstas permanecieron viables y se manifestaron en el tejido al encontrarse en un medio con alta humedad como es el sistema del cultivo *in vitro*. Para el tejido vegetal sin embargo, resultó altamente tóxico y el tejido se oxidó rápidamente después del tratamiento. Se ha comprobado que el H_2O_2 es generado junto con otras especies reactivas de oxígeno como molécula señal para la activación de genes de defensa en respuesta a un patógeno. El H_2O_2 puede estimular un rápido flujo de Ca^{2+} en células de soya, provocando la activación de la muerte celular programada (Prince

et al., 1994 en Sucha y Ravinshankar, 2002). Es probable que la solución de H₂O₂ aplicado a *Pouteria sapota* como desinfectante, tenga el mismo efecto que en la soya, y posiblemente generó una cascada de eventos bioquímicos que activaron la muerte celular programada que derivó en el oscurecimiento y muerte del tejido de las hojas.

El tratamiento de desinfección más efectivo y que no le causó daño al tejido fué con cloro comercial (hipoclorito de sodio) al 20% v/v durante 20-25 minutos. Este agente químico se utiliza comúnmente como desinfectante de material biológico para diversas especies en concentraciones que van del 20-30% v/v en tiempos entre 10 a 30 minutos (Litz, 1988; Fay y Gratton, 1992; Jiménez, 1998; Sudharsan *et al.*, 2003).

El tejido desinfectado por este método no presentó contaminación posterior a los 15 días del establecimiento el cultivo, por lo que se aplicó a todos los explantes de hoja empleados en las réplicas posteriores. Sin embargo, para el explante de hoja siempre se presentó un rango de contaminación de entre el 10 y 15%. Un trabajo realizado en *Pouteria lucuma* reporta un método poco común para la desinfección de explantes. Esta desinfección sólo se logró manteniendo a los explantes durante 5 h inmersos en una solución de antibióticos, 4 fungicidas (mancozeb 80%, benomil 50%, captán 80%) y ácido ascórbico 500 mg/l. Este método de desinfección no es muy común, pues con el tiempo de inmersión del tejido, se corre el riesgo que la oxidación sea rápida y el tejido muera antes de ser establecido asépticamente, de ahí que los autores utilizaran ácido ascórbico en su solución desinfectante (Jordan y Oyanedel, 1992). El trabajo de *Pouteria lucuma* hace evidente la dificultad de lograr el establecimiento *in vitro* de especies de este género, en donde los tratamientos de desinfección típica no son suficientes para establecer un cultivo aséptico. Por lo tanto los resultados obtenidos para *Pouteria sapota* en el establecimiento aséptico de los explantes son alentadores, pues no es un método complicado ni requiere mucho tiempo para lograrse.

Para el establecimiento *in vitro* a partir de endospermo sólo se realizó la desinfección superficial de todo el fruto con cloro comercial (20% v/v), ya que la ubicación anatómica de la semilla dentro del fruto permite extraerla en condiciones asépticas y hace más fácil su establecimiento. En este caso no se presentó contaminación en los cultivos de endospermo y su establecimiento aséptico se logró siempre y cuando el fruto estuviera en buenas condiciones.

Otro factor importante para el establecimiento del cultivo es la oxidación, la cual se manifiesta con el oscurecimiento y posterior muerte tisular. *Pouteria sapota* presenta a lo largo de toda su estructura anatómica canales laticíferos que contienen diferentes compuestos fenólicos, los cuales son liberados al momento de realizar el corte para extraer el explante. En estudios previos realizados para el presente trabajo (resultados no mostrados), se realizó la siembra de los fragmentos de hoja y se sembraron en medio de cultivo adicionado con ácido ascórbico para evitar la oxidación, sin embargo, este antioxidante no resultó efectivo para evitar el oscurecimiento y la posterior muerte del tejido, por tal motivo se adicionó al medio de cultivo el adsorbente polivinilpirrolidona (PVP) para retener los compuestos fenólicos liberados por los canales laticíferos y evitar la oxidación del explante, la cantidad empleada inicialmente fue de 5 g/l con la que se obtuvieron buenos resultados, sin embargo se exploró la posibilidad de disminuir la concentración con el fin de evitar que la concentración usada pudiera tener algún efecto negativo en la inducción de respuestas morfogénicas. La concentración se redujo a la mitad (2.5g/l) con buenos resultados. El PVP se ha utilizado exitosamente para evitar fenolización en especies como *Tectona grandis* (Mascarenhas *et al.*, 1981), *Pouteria lucuma* (Jordan y Oyanedel, 1992), *Annona* spp. (Rasai *et al.*, 1995) y en *Magnolia dealbata* (Jiménez, 2002).

6.2 Cultivo de las hojas

Morfogénesis se define como los eventos morfológicos y fisiológicos involucrados en el crecimiento y desarrollo de un organismo, en la formación de

sus órganos y estructuras características o en la regeneración. La respuesta morfogénica es el efecto de un conjunto de condiciones de crecimiento o cambios en su ambiente que interfieren en la historia del desarrollo de la planta o sus partes (Donnelly y Vidaver, 1988).

Se consideró una respuesta morfogénica al tratamiento si se presentaban cambios físicos notables en la lámina o nervadura del explante. Estos cambios se reflejaron en la aparición de las siguientes características: apariencia rugosa, nodulosa, curvatura con relación al medio de cultivo, o engrosamiento de nervadura.

De los cultivos de hoja realizados en los meses de marzo y abril colectados en Morelos se observaron diferentes respuestas tanto en medio SH como en medio Litz (Tabla 5).

Tabla 5. Cultivo *in vitro* de hojas de *Pouteria sapota* en medios sólidos (Litz y SH). Los tratamientos marcados presentaron por lo menos un explante con alguna respuesta morfogénica.

		2, 4-D (mg/l)							
		0	0.1	0.2	0.5	1	1.5	2	2.5
B	0			♠	♠	♣		♣	
A	0.5								
P	1				♦			♠	
mg/l	2								
	3	♦				♣			

♣ Respuesta sólo en medio Litz; ♦ Respuesta sólo en medio SH; ♠ Respuesta en ambos medios

Ambos medios de cultivo promovieron alguna respuesta en el tejido de hoja, sin embargo fué en el medio Litz en donde se mantuvo una respuesta con producción de callo, pues la respuesta presentada en medio SH no derivó en la formación de tejido nuevo (Tabla 6 y Figura 3).

Tabla 6 Porcentaje y tipo de respuestas presentadas en hojas de *Pouteria sapota* a 40 días de tratamiento.

Tratamiento (medio cit/aux) mg/l	Explantos con Respuesta/Explantos totales sembrados (%)		Tipo de respuesta presentada
	Réplica.1	Réplica 2	
Litz 0/0	¼ (25)	3/9 (33.3)	A
Litz 0/0.2	1/4 (25)	5/8 (62.5)	D, E
Litz 0/0.5	2/4 (50)	5/8 (62.5)	B, D
Litz 0/1	1/4 (25)	0/8 (0)	A
Litz 0/2	1/4 (25)	2/8 (25)	A, D, E
Litz ½	1/4 (25)	0/8 (0)	A
Litz 3/1	1/4 (25)	0/8 (0)	C
SH 0/0	1/4 (25)	1/10 (10)	B
SH 0/0.2	1/4 (25)	4/7 (57.14)	B
SH 0/0.5	1/4 (25)	4/7 (57.14)	B, C
SH 1/0.5	1/4 (25)	2/5 (40)	B
SH ½	1/4 (25)	0/5 (0)	B
SH 3/0	1/4 (25)	0/4 (0)	A

A) Explante con curvatura cóncava con relación al medio de cultivo, con lámina de apariencia rugosa color verde claro, **B)** Explante con aumento de volumen en nervaduras laterales, **C)** Explante con nervadura de apariencia rugosa o nodulosa color claro, con escasa formación de callo de apariencia esponjosa. **D)** Nervadura central superficie de superficie rasgada y competamente oscura, en algunos casos de aspecto noduloso y/o formación de callo de apariencia esponjosa, **E)** Callo de aspecto noduloso formado a partir de nervadura central.

Las respuestas morfogénicas presentadas en la tabla 6 en hojas de mamey a los 60 días es la siguiente:

- A) El explante presentó una curvatura cóncava en relación al medio de cultivo, la lámina conservó el color verde original, presentó apariencia rugosa sin el engrosamiento del tejido en ninguna de sus estructuras. En ningún momento se observó la formación de tejido nuevo (Figura 3A).
- B) El explante aumentó su volumen en las nervaduras laterales, la nervadura central y la lámina no presentaron cambios morfológicos notables y no hubo formación de tejido (Figura 3B).
- C) El explante presentó la formación de zonas nodulares de color más claro en la nervadura central, que dan a la superficie de la nervadura una apariencia rugosa, se observó además en algunos casos la escasa formación de callo esponjoso color amarillo claro (Figura 3C-C').

- D) El explante presentó la nervadura central con aspecto fibroso, rasgado longitudinalmente y completamente oscura, se observó engrosamiento en la nervadura acompañado de la formación de callo esponjoso de apariencia seca en la superficie (Figura 3D).
- E) El explante presentó la nervadura central con aspecto fibroso, rasgado longitudinalmente, de algunas grietas emerge un callo formado por pequeñas estructuras globulares que le dan al tejido apariencia nodulosa (Figura 3 E).

Las respuestas que presentan concretamente la formación de callo son las del tipo D y E (Figura 3D - E), estas respuestas se presentaron sólo en los tratamientos con medio Litz adicionados con 0.2, 0.5 y en menor porcentaje con 2 mg/l de 2,4-D. Esta desdiferenciación y división celular promovida por la auxina se manifestó principalmente en la nervadura central que se encuentra más cerca del peciolo, pues la parte distal de la hoja no presentó ningún tipo de respuesta a ningún tratamiento. La nervadura aumentó su tamaño en el extremo cercano al peciolo provocando el rompimiento de la epidermis y cutícula en la región abaxial, posteriormente se evidenció el crecimiento de callo sobre la superficie de la nervadura (Figura 3 D-E).

Sólo en los tratamientos en medio Litz con 0.5 y 2 mg/l de 2, 4-D (3 y 1 explantes respectivamente) continuaron con el crecimiento de callo en la región abaxial de la nervadura. Cada tratamiento generó un callo con las características siguientes:

- a) Medio Litz con 2 mg/l de 2,4-D: Callo compacto noduloso color amarillo claro y superficie húmeda el cual se tornó ligeramente café después de 5 meses (Resultados no mostrados)
- b) Medio Litz con 0.5 mg/l de 2,4-D: Callo friable ligeramente verde amarillento y superficie seca (Resultados no mostrados).

Se realizó un subcultivo del callo generado a un medio libre de reguladores de crecimiento, adicionado con agua de coco [igual al empleado por Sachdeva y Mehra, (1986) y Jordan y Oyanedel (1992)], sin que se observara la formación de embriones en etapas avanzadas de madurez. El incremento de biomasa fue un factor limitante para realizar los ensayos de proliferación ó inducción organogénica o embriogénica.

De los tratamientos en medio Litz + 2,4-D 0.2 mg/l y 0.5 mg/l se procesó histológicamente un explante para determinar el tipo de respuesta y su origen. Los explantes que mostraron la formación de callo se compararon histológicamente con secciones de hoja que no fueron sometidas al tratamiento. Dado que no hay reportes que describan la estructura anatómica de las hojas de *Pouteria sapota*, fue necesario para este trabajo la descripción de la hoja de mamey, el cual se da a continuación.

Estructura anatómica de la hoja de mamey sin tratamiento de inducción morfogénica.

En el corte transversal del explante original (lámina) se observa la epidermis (e) abaxial y adaxial uniestratificada de células parenquimáticas de forma isodiamétrica con presencia de estomas en el lado adaxial y una cutícula evidente (Figura 4A). En la prueba histoquímica con vainillina y HCl se evidenció la presencia de abundantes taninos en todo el mesófilo (datos no mostrados).

El mesófilo está compuesto de tejido parenquimático fundamental ubicado entre la epidermis adaxial y abaxial de la hoja con una clara diferenciación en tejido de empalizada (mp) y esponjoso (ms) (Figura 4A). El mesófilo en empalizada (mp) es compacto y está formado por 2 estratos de células alargadas. Este tejido está penetrado por laticíferos articulados (l) de aproximadamente el doble de su diámetro ecuatorial con respecto a las células del tejido en empalizada y fuertemente asociados a los haces vasculares (Figura 4A). Los haces menores (hv) de la lámina son del tipo colateral con el xilema (x) hacia el haz y floema (f)

orientado hacia el envés, con la posible presencia de numerosas fibras floemáticas (ff) dependiente del tamaño de la hoja (Figura 4A). El mesófilo esponjoso (ms) está formado por células isodiamétricas con espacios intercelulares no mayores al diámetro de las células vecinas. La nervadura central (nc) es prominente hacia la cara abaxial (Figura 4B). El xilema es interno y el floema externo. La presencia de fibras floemáticas es una característica asociada a la madurez de la hoja (Figura 4C). El tejido fundamental de la nervadura presenta ideoblastos cuyos taninos tienen una apariencia condensada (Figura 4C). Este tejido está penetrado por numerosos laticíferos articulados los cuales recorren longitudinalmente la nervadura, siendo más abundantes en el parénquima externo al cilindro vascular de la nervadura. La prueba histoquímica con vainillina y HCl evidenció la presencia de menos taninos que los detectados en la lámina.

Cambios morfoanatómicos del explante cultivado en medio Litz adicionado con 2,4-D 0.2 mg/l

La lámina del explante presentó un color verde-amarillento. Entre las nervaduras hubo evidencia de alargamiento (Figura 3 A).

La figura 4D muestra la vista paradormal de la nervadura central, ésta presentó un ensanchamiento horizontal entre la parte media del explante hacia uno de los extremos después de 44 días de cultivo en medio Litz. La superficie de la nervadura se observó rasgada longitudinalmente. En esta zona se desarrolló un tejido tipo callo, de apariencia nodulosa y aspecto seco, más evidente en el área cercana al corte del explante.

La lámina no presentó cambios importantes en su estructura interna con respecto al explante original descrito anteriormente, con excepción de las siguientes observaciones: el mesófilo esponjoso desarrolló mayores espacios intercelulares; algunas zonas de la lámina se encontraron necrosadas.

La nervadura central presentó cambios evidentes; perdió continuidad del cilindro vascular en la región subepidérmica de la zona adaxial, resultado de una

actividad meristemática no organizada y una falta de regionalización de los elementos vasculares (Figura 4E). La zona adaxial presentó una franja de parénquima con una alta actividad mitótica que se refleja en la presencia de nuevas células con planos de división periclinal, las cuales dieron origen a hileras de células nuevas, muchas de ellas con abundantes taninos (Figura 4E). Este fenómeno contribuyó al aumento de volumen de la región abaxial de la nervadura.

El medio Litz + 2,4-D (0.2mg/l) promovió la diferenciación *de novo* de puntos meristemáticos de arreglo concéntrico en la región subepidérmica abaxial, cuyas células dan origen a elementos traqueales y floemáticos que podrían interpretarse como haces vasculares jóvenes (Figura 4 F y 5A).

La epidermis de la nervadura originalmente uniestratificada, se mantuvo sólo en la cara abaxial del explante, y en la región adaxial la epidermis fue sustituida por una peridermis (Figura 4 F).

Una porción del callo generado de estos experimentos se removió de la nervadura con el objetivo de incrementar su biomasa, esta porción se sembró en medio líquido con la fórmula original de inducción, empleando puentes de papel como soporte. Cinco días después de que se realizó el subcultivo el tejido se tornó oscuro lo cual fue muestra clara de oxidación por la alta sensibilidad de los tejidos de esta especie.

Cambios morfoanatómicos del explante cultivado en medio Litz 0/0.5 mg/l 2,4-D

La nervadura central presentó un mayor volumen en la cara adaxial (Figura 5B) característica que se vio reflejada en un aumento de volumen, que fue resultado de un crecimiento del tejido fundamental de la nervadura, el cual presentó un arreglo radial producto de numerosas divisiones periclinales de las células parenquimáticas (Figura 5C). En la zona adaxial aparecieron puntos meristemáticos concéntricos y meristemas en fila (Figura 5C-D). El crecimiento pronunciado del tejido fundamental promovió el rompimiento de la epidermis y

estratos subepidérmicos los cuales parecen haber tenido una tasa de división y/o alargamiento menor que los estratos internos (Figura 5C).

El inicio de eventos morfogénéticos y de desarrollo en un explante aislado *in vitro* está asociado con la pérdida de un control integral coordinado y correlacionado (Ziv, 1999). El aislamiento y herida de un tejido extirpado lo expone a nuevas señales del medio de cultivo y a la formación de nuevos gradientes, que inducen una serie de eventos fisiológicos y moleculares que lo llevan a la desdiferenciación. Con estos nuevos gradientes y diferentes señales, la reorganización comienza con una división celular más coordinada y la formación de nuevos centros meristemáticos. La expresión morfogénica organizada y rediferenciación ocurren cuando una nueva correlación entre células se establece en el meristemo, seguido por la formación de estructuras unipolares o bipolares como son la formación de órganos o de embriones somáticos (Ziv, 1999).

La constitución del medio nutritivo es un factor clave para el éxito del cultivo, se ha probado experimentalmente que cada especie y cada tipo de explante responde diferente a un mismo medio de cultivo. Distintos medios de cultivo han sido diseñados continuamente a base de ensayo y error. Al probar dos medios de cultivo en este estudio se reflejó el estado fisiológico y los requerimientos nutricionales de cada tipo de explante. Esto se vió reflejado en los resultados obtenidos ya que en hoja el medio Litz favoreció la generación de callo en el 26 % de los explantes mientras que el medio SH sólo mostró el engrosamiento de la nervadura en el 29 % de los explantes, sin la proliferación de callo ni brotes (Tabla 6). El callo generado en el medio Litz podría ser un tejido con potencial organogénico que, explorando las concentraciones de macro y microelementos del medio, podría derivar en la formación de brotes. El medio Litz es una combinación de los macronutrientes del medio B5, los micronutrientes del medio MS, adicionado con caseína hidrolizada, arginina, glutamina, asparagina, ácido ascórbico y 60g/l de sacarosa (ver apéndice). Se ha reportado su efectividad en el cultivo de especies tropicales como *Carica papaya* (Litz y Conover, 1983), *Euphoria*

longan (Litz, 1988) *Ceratozamia mexicana* (Chávez et al.,1995), *Ceratozamia euryphyllidia* (Chávez et al., 1998), y *Mangifera indica* (Litz et al.,1995).

Los reguladores del crecimiento jugaron un papel determinante en las respuestas obtenidas, aunque el porcentaje de respuesta registrado en general fue bajo pero consistente. Los mayores porcentajes de respuesta ocurrieron con 0.2 y 0.5 mg/l de 2,4-D, en los que se observó la formación de callo (Tabla 6). La combinación de 2,4-D y BAP por otra parte no favoreció la formación de callo, y el BAP por si sólo no estimuló al tejido hacia la generación de brotes. Se ha reportado que en cassava (*Manihot esculenta*) el BAP adicionado al medio de cultivo produjo un callo friable no embriogénico, el empleo simultáneo de BAP o una combinación con ANA resultó inhibitoria para la producción de plantas completas (Gouhua y Qiuxheng, 2002). Resultados similares se han obtenido en cultivos de *Hylomecon vernalis* (Kim et al., 2003). En el presente estudio tampoco se obtuvo una respuesta cuando los explantes se trataron con combinaciones de citocina/Auxina, lo cual puede indicar también un efecto inhibitorio en el tejido ante los dos tipos de reguladores del crecimiento.

Se ha observado que el 2,4-D es esencial para la producción de callo en tejido somático, sin embargo la concentración utilizada puede ser muy variable. En cultivos de hoja de *Ipomoea batatas* se logró la inducción de callo organogénico con 0.2 a 0.4 mg/l de 2,4-D. De igual manera se logró la regeneración de brotes en concentraciones bajas de 2, 4-D en hojas de *Prunus canescens* (Antonelli y Druart, 1990).

Es bien conocido que la auxina es un factor clave para la inducción de callo, sin embargo el tipo y el tiempo de inducción requerido para la formación de un callo morfogénico es variable para cada especie e incluso para cada tipo de explante de una misma especie. Estudios en *Manilkara sapota* (Sachdeva y Mehra, 1986) reportaron diferencias en la respuesta al tipo de auxina dependiendo del explante; se encontró que los explantes con mejor respuesta al 2,4-D son hojas, cotiledones, embriones y endospermo, mientras que la raíz, tallo, hipocótilo y

yemas adventicias responden mejor al ANA. En el presente estudio la nervadura central de mamey formó un callo más o menos compacto color amarillo claro al ser inducido en medio Litz adicionado con 2,4-D (0.5 y 0.2 y 2 mg/l). El callo inicialmente regenerado a los 50 días de cultivo fue compacto, pero posteriormente se hizo ligeramente friable con un color amarillo verdusco que tendía a desprenderse fácilmente del tejido original (ver figura 3 D y E). Respuestas similares se observaron en explantes de hoja de *Manilkara zapota* en donde se obtuvo un callo blanquecino-verdusco inducido con la adición de cinetina y 2,4-D el cual posteriormente dio origen a un callo con células embriogénicas al ser subcultivado en medio reemplazando la cinetina con BAP (Sachdeva y Mehra, 1986). *Pouteria sapota* presenta características de crecimiento de callo semejantes al de chicozapote reportado por Sachdeva y Mehra (1986), sin embargo no se registró un crecimiento acelerado después del subcultivo a medio libre de reguladores.

Jordan y Oyanedel (1992) obtuvieron la formación de callo en *Pouteria lucuma* a partir de secciones de hojas incluyendo el peciolo, tomadas de plántulas de 3 años de edad, los explantes formaron callo organogénico abundante cuando fueron tratadas con medio MS adicionado con TDZ y ANA, el crecimiento del tejido se dió solo en la base del peciolo. Tanto el trabajo con *Manilkara zapota* como el de *Pouteria lucuma* concluyen que la acción sinérgica de citocininas y auxinas es determinante para la inducción de tejido a partir de explantes de hoja. En el presente estudio para *Pouteria sapota* las combinaciones realizadas de BAP/2,4-D no resultaron en la formación de callo, por el contrario, no se obtuvo la formación de tejido en esos tratamientos con combinaciones de auxina/citocinina. Aún así no se descarta la posibilidad de que éste efecto sinérgico pueda impulsar la consolidación de brotes o embriones en el medio de proliferación una vez que haya inducido la formación de callo con 2,4-D.

Para todos los tratamientos (0.2, 0.5 y 2 mg/l de 2,4-D) se observó que en *Pouteria sapota* sólo se pudo obtener callo a partir de la nervadura central de secciones de hoja proximales al peciolo cuando fueron estimuladas con

concentraciones bajas de 2,4-D. El estudio histológico reveló que el tejido que respondió al estímulo exógeno es el parenquimático.

Se ha reportado que hay un gradiente considerable en el contenido de auxina endógena entre el lado distal y proximal de la línea de abscisión de la hoja; este contenido es bajo en el lado distal y alto en el proximal. Fisiológicamente el efecto de este gradiente hormonal está relacionado con la abscisión de la hoja, el AIA inhibe la abscisión y retarda la maduración de la hoja evitando que se desprenda del tallo (Sebánek *et al.*, 1991). La zona de transición ha demostrado ser competente para el estímulo morfogénico promovido por el cultivo de tejidos en *Gypsophila paniculada* (Zuker *et al.*, 1997). En este ejemplo se obtuvo la regeneración de brotes sólo de la base de la hoja específicamente de las células de la zona de transición. Existen reportes de que el peciolo es una parte muy susceptible para la regeneración de plántulas por cultivo de tejidos como en el caso de *Rosa hybrida* (Marchant *et al.*, 1996) donde explantes de peciolo se han utilizado para la obtención de callo embriogénico. Otros ejemplos de morfogénesis a partir de peciolos se han obtenido con violeta africana (Bilkey *et al.*, 1978), *Begonia gracilis* (Castillo y Smith, 1997), *Heracleum candicans* (Wakhlu y Sharma, 1998), y *Petasite hybridus* (Wildi *et al.*, 1998), *Malus domestica* (Rugini y Muganu, 1998) e *Hylomecon vernalis* (Kim *et al.*, 2003).

El análisis histológico de los explantes con respuesta en medio Litz enriquecido con bajas concentraciones de auxina, reveló que se promovió la formación de callo con diferenciación de tejido vascular (Figura 5A). En condiciones naturales se ha observado que la auxina representa una señal inductora que inicia la diferenciación de elementos traqueales cuando se presenta una herida en el tallo de la planta, se ha propuesto que ésta respuesta está dada por la necesidad de la planta de mantener funcionalmente intacto el tejido vascular para su sobrevivencia (Aloni 1995). En cultivo de tejidos se induce a la formación de brotes *de novo* es decir, estructuras formadas a partir de tejido que originalmente tenía una organización distinta a la promovida. Al revisar

secuencias de cortes histológicos transversales y longitudinales en los explantes con 0.2 mg/l 2,4- D, se comprobó que las estructuras formadas no tenían origen en haces vasculares previamente formados por lo que se puede afirmar que las estructuras nuevas formadas no tenían origen en los haces vasculares de la nervadura de la hoja, son estructuras *de novo* que podrían tener el potencial para derivar en un brote y dar origen a una planta completa. Para lograr este objetivo es importante explorar experimentalmente los tiempos de inducción y el medio de proliferación que ayude a que el meristemo se consolide y desarrolle como un brote bien definido.

Por otro lado el estado fisiológico de la planta madre también influye directamente en la competencia morfogénica del explante. Es bien conocido que el cultivo de tejidos a partir de órganos de individuos maduros puede ser un proceso más complejo, menos frecuente y más lento, que aquel iniciado de individuos juveniles. Además se ha visto que hay periodos específicos durante el ciclo del crecimiento anual cuando algunos tejidos y meristemos expresan mayor plasticidad morfogénica. Para micropropagar árboles maduros es importante explorar estas etapas y descubrir la más propicia para la morfogénesis (Bonga y Von Aderkas, 1992; Chávez *et al* 1992; Chávez *et al*, 1998).

En las plantas se ha visto que hay un efecto regulador relacionado con la edad de la hoja indudablemente asociado a un cambio en el contenido de las fitohormonas y a una concentración diferencial de éstas conforme cambia la edad. No obstante, se sabe que las hojas jóvenes tienen un contenido más alto de auxinas que las hojas de mayor edad y también se sabe que el contenido de citocininas en las láminas de las hojas decrece con la maduración y el envejecimiento (Sebánek *et al.*, 1991). La concentración de los niveles de auxina natural del explante es difícil de precisar y puede ser un factor de gran influencia en los resultados obtenidos (Blake y Hornung, 1995). En general se sabe que la capacidad de regeneración de explantes de hojas jóvenes es más alta que la de explantes más maduros (Zuker *et al.*, 1997).

Además de los balances endógenos de auxinas y citocininas se ha observado que el número de células potenciales en el explante está directamente involucrado en la respuesta morfogénica del tejido (Blake y Hornung, 1995). El estado fisiológico del explante influye directamente en la competencia morfogénica de éste, la cual depende del número de células potenciales en el explante para responder al estímulo y crecimiento *in vitro*. En la lámina la auxina exógena sólo promovió el alargamiento celular, que le dio esa apariencia de crecimiento entre las nervaduras. En ningún explante se observó la formación de áreas meristemáticas o callo en la lámina, debido posiblemente al hecho de que es un tejido ya organizado en el que no se mantienen células con potencial morfogénico. El tejido de la lámina se encontraba en expansión al momento de disectarlo de la planta madre. Estudios realizados en tabaco y girasol demostraron que el destino de la hoja está establecido desde etapas muy tempranas en la formación del primordio de hoja, y que en algunos casos llega a ser irreversible (Steeves y Sussex, 1989).

Aún en el sistema *in vitro*, se ve reflejado el ciclo biológico largo que presenta *Pouteria sapota*, pues el crecimiento del tejido regenerado fue muy lento y la formación de brotes o embriones verdaderos no tuvo lugar aún después de un año de incubación. Es posible, que el subcultivo a un medio totalmente libre de reguladores del crecimiento [procedimiento sugerido para la inducción morfogénica (George y Sherrington (1988)], inhiba la continuación del crecimiento y diferenciación de los meristemas vasculares, por lo que sería necesario adicionar bajas concentraciones de citocininas una vez inducida la formación de callo y explorar los requerimientos nutricionales del explante para llegar a la consolidación de estructuras organizadas y funcionales.

Los resultados obtenidos hasta el momento nos dan pauta para pensar que podría ser posible la inducción morfogénica en explantes de hoja si se determinan tres condiciones:

- 1) El tiempo adecuado de inducción en medio Litz con 0.2 ó 0.5 mg/l de 2,4-D
- 2) Encontrar las condiciones de cultivo que aceleren el crecimiento del callo obtenido, en especial la temperatura y,
- 3) Las modificaciones a las concentraciones de macro y micro nutrientes del medio Litz junto con los reguladores del crecimiento, que permitan la expresión de los brotes y su posterior elongación en el medio de proliferación.

6.3 Cultivo de Endospermo

El endospermo es un tejido especial formado casi siempre por la fusión de tres núcleos haploides durante la fertilización de la célula central del saco embrionario. El endospermo triploide ($3n$) sirve como tejido nutricional durante el desarrollo del embrión. Las técnicas de cultivo de endospermo proveen nuevas posibilidades para la obtención de plantas triploides, las cuales resultan más vigorosas y de crecimiento más rápido que las formas diploides o tetraploides. La reducción del número de semillas en frutos triploides puede tener un importante significado comercial (Sebánek *et al*, 1991).

En el presente estudio se observó que el endospermo de mamey es un tejido translúcido de consistencia gelatinosa que disminuye en cantidad conforme avanza el desarrollo del embrión. Romero (2005) reportó que el endospermo de *Pouteria sapota* tiene un desarrollo tipo nuclear, el cual inicia con numerosas divisiones nucleares sin la formación de paredes celulares formando un sincicio. Esta situación cenocítica se mantiene en frutos menores de 22 mm de diámetro, superado este tamaño, se da el inicio de la formación de paredes para formar un endospermo celular. Romero (2005) observó una variación notable en el tamaño del embrión en etapas tempranas del desarrollo embrionario; así mismo corroboró el consumo casi total del endospermo durante el desarrollo embrionario y su

presencia en la madurez como una capa biestratificada de células ricas en lípidos que rodea al embrión.

En el presente trabajo se exploró el potencial morfogénico del endospermo y embrión provenientes de semillas inmaduras. El primer ensayo se realizó con frutos jóvenes con un diámetro entre los 30 - 40 mm, de árboles de la huerta de Coatlán del Río, Morelos. Dado que se contaba con pocos frutos, se hizo un ensayo en los medios Litz y SH con 2,4-D o BAP en concentraciones de 0.5 y 2 mg/l y 4 repeticiones por tratamiento.

En los primeros 15 días de tratamiento, el tejido sembrado no mostró cambios morfológicos notables y solamente se observó el cambio de color en el tejido, el cual pasó de translúcido a un color gris-azulado muy tenue (Fig. 6B). Los primeros indicios de respuesta morfogénica se observaron a los 30 días con el cambio de consistencia del explante y la formación apenas visible del tejido generado (Figura 6C). A los 60 días de cultivo, en ambos medios fue notoria la respuesta de algunos explantes de endospermo (Figura 6D). Después de 75 días en medio de inducción se transfirieron a medio sin reguladores del crecimiento. Se observó la formación de un tejido con estructuras nodulares apenas visibles, derivadas directamente del explante, el crecimiento fue muy lento y heterogéneo. El experimento se repitió 3 veces. La segunda y tercer réplicas se realizaron con frutos de árboles silvestres de la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, con frutos de diámetros entre los 25 y 40 mm. En la cuarta réplica sólo se emplearon frutos de la huerta de Coatlán del Río con diámetros más homogéneos de 25 a 30 mm (Tabla 7).

Los explantes que regeneraron tejido nuevo mostraron diferentes tipos de callo. La descripción y clasificación del tipo de crecimiento se ilustra y describe en la Figura 7:

Tabla 7. Respuesta morfogénica en tejido de endospermo de semillas inmaduras de *Pouteria sapota* a los 70 días de tratamiento.

Tratamiento medio; BAP/2,4-D mg/l	No. de explantes con respuesta por replica (% respuesta)				Observaciones (Tipo de respuesta)
	1	2	3	4	
Litz 0 / 0	0 de un total de 4 (0%)	0/4	0/8	0/14	Explante inicialmente hialino, totalmente oscuro, sin respuesta
Litz 0/0.5	1/4 (25)	0/5 (0)	0/7 (0)	0/13(0)	Callo oscuro, nodular friable (A) (Figura. 7A)
Litz 0/2	1/4 (25)	0/6 (0)	0/9 (0)	0/12 (0)	Callo oscuro en el centro del tejido, rodeado de tejido amarillo claro o beige ligeramente, compacto. (Figura. 7 B)
SH 0/0	1/4 (25)	0/4 (0)	1/11 (9)	3/15 (20)	Callo muy compacto liso color crema (Figura. 7C)
SH 0.5/0	1/4(25)	2/5 (40)	3/10 (30)	4/14 (21)	Callo compacto amarillo claro con estructuras globulares (Figura 7F)
SH 2/0	1/4 (25)	1/7 (17)	1/9 (11)	0/15 (0)	Callo nodular. compacto, amarillo claro (Figura 7D)
SH 0/0.5	0/4 (0)	3/8 (37.5)	-----	3/16 (18.7)	Callo compacto, amarillo claro (Figura 7E)

En los experimentos realizados con el endospermo de mamey se observaron más explantes con respuesta en medio SH que en medio Litz, en éste último la respuesta fue escasa. Los explantes en general se tornaron gradualmente de transparentes a color café o gris claro, oscureciéndose posteriormente. Sólo de un extremo del explante ocurrió la regeneración de tejido nuevo en algunos tratamientos (Figura 6 C-D), el resto del explante permaneció oscuro y sin cambios morfogénicos. En medio SH se dio la formación de estructuras nodulares que derivaron posteriormente en formas semejantes a embriones, el tejido generado no

presentó la morfología externa típica de un callo, en el que comúnmente se observa una masa de tejido indiferenciado de forma y superficie irregular. En el presente estudio se generaron estructuras semiesféricas o nódulos de contorno organizado de superficie lisa, aspecto húmedo, turgente, hialino, de color blanco hasta amarillento. Estas estructuras no pueden considerarse un callo en sentido estricto, ya que no es un tejido irregular y amorfo. A lo largo del cultivo, el crecimiento del tejido no derivó en embriones maduros, se observó el aumento de tamaño de todo el tejido generado, incluyendo las estructuras nodulares. Por otro lado la mayoría de las descripciones de cultivos embriogénicos cumplen con lo descrito para nuestros cultivos de *Pouteria sapota*. [Ejemplos: *Euphoria longan* (Litz, 1988), *Manguifera indica* (Litz et al., 1995), *Ceratozamia mexicana* var. *Robusta* (Chávez et al., 1995), *Citrus* spp. Gosal et al., 1995), *Cocos nucifera* (Blake y Hornung, 1995), *Santalum album* (Sankara Rao et al., 1996), *Ceratozamia euriphyllidia* (Chávez et al., 1998), *Clematis intergrifolia* x *C. viticella* (Mandegaran y Sieber, 2000), *Acacia mangium* (Xie y Hong, 2001), *Scaevola aemula* (Wang y Bhalla, 2004), *Paulownia elongata* (Ipekci y Gozukirmizi, 2004), *Pinellia tripartita* (Kim et al., 2005)].

Estructuras similares se obtuvieron en diferentes explantes de *Manilkara sapota* en medio SH (Sachdeva y Mehra, 1986). Los autores observaron la formación de “nódulos embrioidales” directamente de la superficie de explantes como hipocótilo, raíz, tallo, hoja, cotiledones, embriones y ápices de brote, sin la intervención de callo. En lo sucesivo al referirnos a las estructuras obtenidas en el presente estudio utilizaremos los términos “callo” ó nódulos embrioidales (NEM) por la gran similitud que presentan las estructuras de *Pouteria sapota* con lo reportado con Sachdeva y Mehra.

En el medio Litz también se observó la formación de callo a partir de tejido de endospermo con 0.5 y 2 mg/l de 2,4-D. La apariencia de este tejido fue diferente al generado en medio SH. En un principio el color fue café claro con zonas oscuras, friable y con pequeñas regiones compactas (Figura 7A). Sin embargo, después de 6 meses y cambio a medio sin reguladores del crecimiento,

este tejido cambió de su consistencia friable a consistencia compacta de color café oscuro, superficie irregular y apariencia seca (Figura 7B). No se registraron estructuras diferenciadas. Este evento se registró en sólo 2 explantes por lo que el resultado no fue consistente y es de suponer que entre otros factores el medio Litz no fue favorable para el cultivo de endospermo de esta especie (Tabla 7).

Para ambos medios el endospermo que generó nódulos embrioidales provenía de frutos de entre 30 a 35 mm de diámetro, en el cual la cantidad de endospermo celular es abundante, con mayor tamaño no se reportó crecimiento de nodulos embrioidales.

Los resultados obtenidos indican que el medio SH favoreció la inducción de nodulos embrioidales (NEM) a partir de endospermo, este medio es rico en sales minerales y no tan rico en compuestos orgánicos ya que, la adición de agua de coco y vitaminas fueron los únicos complementos orgánicos. Un medio de cultivo similar fué empleado para inducir etapas embrionarias tempranas de *Manilkara sapota* (*Achras sapota*) (Sachdeva y Mehra, 1986).

Esta respuesta puede estar determinada en parte por la cantidad de nutrientes requeridos por el explante para hacer posible la desdiferenciación y formación de callo. El endospermo, al ser un tejido directamente involucrado en el desarrollo del embrión, contiene suficientes sustancias de reserva y hormonas que pueden actuar conjuntamente con el medio de cultivo para estimular a las células del endospermo hacia la morfogénesis. El medio SH contiene pocos compuestos inorgánicos y orgánicos, pero en altas concentraciones, los cuales junto con los reguladores del crecimiento, logran estimular a las células del endospermo hacia una respuesta morfogénica. El medio SH fue efectivo para el cultivo de especies leñosas (García-Campusano, 1999; Goldfarb *et al.*, 1996). Sachdeva y Mehra (1986) indican la regeneración de brotes y etapas embrionarias tempranas de *Manilkara sapota* (*Achras sapota*) en medio SH.

En el presente estudio se observó que sólo en un extremo del explante ocurrió el crecimiento y diferenciación de los NEM. Respuestas similares se

observaron en *Cocos nucifera* en donde la formación de tejido embriogénico fue dependiente de la edad del fruto y de la región de endospermo de donde se tomó el explante, pues se observó que el endospermo cercano al micrópilo es más propenso a formar callo embriogénico que el extremo antipodal. Este fenómeno está relacionado con el desarrollo asincrónico del endospermo, el cual es progresivo de la región antipodal a la región micropilar (Ceniza *et al.*, 1992). Esta respuesta relacionada con la región del endospermo usada como explante, se observó también en endospermo de *Acacia nilotica* (Garg *et al.*, 1996) en donde la regeneración de tejido se dio sólo en el extremo cercano a la calaza. En los dos ejemplos anteriores fue evidente que, el grado de maduración del tejido de endospermo, es un factor importante para la inducción de respuestas morfogénicas. En *Pouteria sapota* el desarrollo de endospermo es temprano con relación al del embrión, dado que el endospermo inicia primero sus divisiones. Su condición cambia de sincicial a un endospermo celular desde la periferia hacia el centro de la semilla. Para este momento el embrión se encuentra en estado globular y se acelera su crecimiento cuando el fruto supera los 26 - 29.9 mm de diámetro (Romero, 2005). Los explantes utilizados en este trabajo ya presentaban embriones cigóticos en estadios posteriores a los globulares, y el tamaño de los embriones y la cantidad de endospermo, fue muy variable por lo que es probable que, el estado de desarrollo en el que se encuentra el endospermo, determine también su competencia para la morfogénesis junto con factores como el medio de cultivo y los reguladores del crecimiento.

El tratamiento control en medio SH mostró la formación de callo en 4 explantes. Sin embargo, sus características fueron diferentes a las obtenidas en el mismo medio con reguladores del crecimiento. En general, el callo fue muy compacto, presentó un color amarillo claro, una superficie lisa y una apariencia ligeramente húmeda, sin la formación de estructuras nodulares en la mayoría de los casos (Figura 7C). El crecimiento se detuvo a los 60 días de cultivo sin haber observado la formación de ninguna estructura organizada.

En el tratamiento control se observaron dos tipos de respuestas en los explantes tratados:

Respuesta tipo 1: La apariencia externa del explante mostró un color gris oscuro y el tejido regenerado presentó bordes amarillo claro. El resto del tejido presentó aspecto noduloso y compacto con un color blanquecino (Figura 8 A). El explante se procesó para su estudio histológico y arrojó las siguientes características: presencia de células isodiamétricas con citoplasma denso en la parte media del tejido. Hacia la periferia del tejido se observaron células de menor tamaño con núcleos grandes, pero no se observó ningún patrón de crecimiento en el tejido (Figura 8 B).

Respuesta tipo 2: El tejido regenerado presentó la formación de una estructura globular muy definida de color verde, superficie lisa y compacta. En la parte basal de esta estructura se observó la formación de un callo con aspecto nodular en las zonas de mayor contacto con el medio de cultivo (Figura 8 C).

En el análisis histológico se observaron células de parénquima isodiamétricas, con citoplasma denso. En algunas células se observaron núcleos grandes y en general grandes cantidades de almidón. En todo el tejido también se observó la presencia de taninos (Figura 8E). El análisis histológico no mostró ninguna estructura anatómicamente definida en el tejido regenerado (Figura 8 D).

Cultivo de endospermo en medio SH líquido + BAP 0.5 mg/l .

Este tratamiento promovió más cambios morfogénéticos en los explantes comparado con los otros experimentos, con la existencia de una respuesta en el 20 al 40% en todas las replicas.

Los cambios que presentaron los explantes en este tratamiento, hasta la formación de estructuras nodulares, se muestran en la Figura 6. El explante produjo un tejido del que se distinguieron dos regiones: la porción basal de apariencia compacta de color amarillo claro y la porción externa hialina con estructuras nodulares que sugieren la presencia de embriones somáticos en estado

globular (Figura 9A). El explante produjo estructuras semiesféricas o nódulos de contorno organizado, suave de aspecto húmedo, turgente, de color hialino, blanco hasta amarillento, que, como se mencionó anteriormente, no puede considerarse un callo *per se*. Por otro lado la mayoría de las descripciones de cultivos embriogénicos cumplen con lo descrito para los cultivos obtenidos en este estudio. Estas características se han observado en cultivos embriogénicos derivados de embriones inmaduros, endospermo y pecíolo en especies como el árbol *Liriodendron tulipifera* (Radojevic, 1988 citado en Vonga y Von Aderkas, 1992), el chile *Capsicum annuum* (Kintzios *et al*, 2001), y el durazno (Scorza *et al*, 1990).

Se realizó el análisis histológico para identificar la respuesta obtenida. Se observó que la porción media basal del callo se encontró constituida por células grandes de paredes delgadas con poco citoplasma y sin núcleos evidentes. La porción externa del callo es un tejido que presentó evidencia de una alta actividad meristemática, caracterizada por células pequeñas, citoplasma denso, núcleos evidentes y la presencia de células en división (Figura 9 B). En esta región se observa el desarrollo de estructuras globulares meristemáticas con polaridad, las cuales, no presentan los patrones de división celular típicos de embriones sexuales que dan lugar al protodermo y células centrales del cuerpo del embrión. Cabe mencionar que las estructuras globulares de *Pouteria sapota* presentan células pequeñas de arreglo concéntrico con núcleos evidentes en activa división, las cuales son diferentes al resto del tejido (Figura 9). Estas características son similares a las presentadas en embriones zigóticos de *Manilkara sapota* (Zavaleta-Mancera y Engleman, 1994)

Sólo se observó la formación de NEM en el “callo” generado en medio SH con BAP 0.5 mg/l, al ser transferido al medio sólido sin reguladores. El “callo” se mantuvo en este medio en espera del incremento de biomasa ó de la consolidación de las masas proembrionarias, aunque, el aumento de biomasa fue muy lento. Las estructuras globulares inicialmente formadas perdieron el aspecto hialino y se tornaron de color amarillo cremoso, tomando un aspecto más compacto y

perdieron su forma globular. Después de 14 meses en cultivo y 2 cambios de medio fresco, se observó que el callo se fragmentó ligeramente, se desprendieron pequeñas porciones de tejido con un color ligeramente anaranjado, con formación de cuerpos globulares de superficie lisa (Figura 9 D). Estos nuevos glóbulos formados presentaron un extremo ligeramente más anaranjado (Figura 6 F). Después de 7 días de estas observaciones, el tejido se tornó más anaranjado y las estructuras globulares adquirieron formas ovoides con una ligera coloración roja en el extremo distal en relación al callo del que se originó (Figura 9 D).

Las observaciones histológicas de este tejido confirmaron los anteriores resultados, la única diferencia fue que además de los arreglos concéntricos iniciales se observaron etapas más avanzadas con formas ovoides. Se mantiene la falla en la formación del embrión durante todo el cultivo de los nódulos embrioidales. Esta falla está relacionada con las primeras divisiones en el cuerpo del embrión joven que dan origen primero, a un protodermo y al meristemo fundamental, los cuales darán origen a los sistemas dérmico, vascular y fundamental del embrión maduro.

Sachdeva y Mehra (1986) indican la formación de callo embriogénico en diferentes explantes de *Manilkara zapota*. Los callos obtenidos fueron inicialmente no friables de color amarillento de lento crecimiento, en el cual se pueden generar dos tipos de embrioides iniciales; un tipo pequeño y redondo y el otro elongado y ovoide, con grandes contenidos de almidón, los cuales posteriormente asumen las formas de embriones globulares o tipo corazón. La morfología de los embrioides desarrollados de endospermo de *Pouteria sapota* es similar al descrito para *Manilkara zapota*. El tejido generado presentó estructuras semiesféricas o nódulos de contorno organizado, suave, de aspecto húmedo, turgente de color hialino, blanco o hasta amarillento. Los nódulos embrioidales que se presentaron después de un periodo largo en medio SH adicionado con 0.5 mg/l BAP, no derivan en formas embriogénicas diferenciadas, aunque su morfología externa es la de embriones somáticos (Figura 9 A y D).

El paso inicial primordial para establecer la histodiferenciación de un embrión somático es la diferenciación del protodermo (Yeung, 1995). A pesar de que las estructuras obtenidas en esta especie tienen una apariencia globular y meristemática, e incluso en algunos casos con polaridad y una diferenciación en suspensor y cuerpo del embrión, no se presentó la histodiferenciación típica de un embrión zigótico, caracterizada por la diferenciación de un protodermo. Williams y Maheswaran (1986) sugieren que los patrones de segmentación que provocan la formación del nódulo meristemático –el proembriode globular- es independiente de la habilidad de este grupo de células para establecer un control integrado e iniciar la formación de un embrión bipolar. Ésta podría ser la razón de la formación de nódulos meristemáticos de tipo embrioides.

La formación de tejido con apariencia embriogénica se ha reportado en plátano, en donde secciones de meristemo presentaron la formación de estructuras iniciales tipo embriogénicas, que en algunos casos derivaron en formas embriogénicas aberrantes sin prosperar en plántulas (Balbão *et al.*, 2001).

Pese a que el callo regenerado con 0.5 mg/l BAP en medio SH fue inicialmente un callo con potencial embriogénico. El desarrollo de estos proembriones no ha derivado en la formación de embriones normales en etapas embrionarias avanzadas. Se puede ver en la Figura 10 D-F las similitudes histológicas que presenta este tejido con el tejido embriogénico de *Musa spp.* (Balbão *et al.*, 2001), en el que también se están formando zonas concéntricas de alta actividad meristemática que posteriormente derivaron en embriones somáticos de plátano. Las estructuras generadas reconocidas en *Pouteria sapota* correspondieron muy probablemente a estados tempranos de embriones somáticos.

Cultivo de endospermo en medio SH líquido + 2 mg/l BAP .

El explante de origen produjo un callo de apariencia muy compacta de color amarillo-claro y con la superficie ligeramente nodulosa (Figura 10A). Aunque el porcentaje fue mucho menor a lo presentado para el tratamiento anterior (Tabla 7),

se realizó el análisis histológico para comparar la respuesta del tejido en presencia de una mayor concentración de citocinina, en éste análisis se observó lo siguiente: la porción media basal del callo estuvo constituida por células grandes con poco citoplasma y sin núcleos evidentes, y presentó acumulación de almidón en su interior. La porción externa del callo presentó células con evidencia de actividad meristemática, que a diferencia del tratamiento anterior, se presentaron en menor cantidad las células pequeñas y con pocas placas de división. Algunas de estas células presentaron un arreglo concéntrico que semejan etapas embrionarias tempranas (Figura 10C). Sin embargo no se observó ningún patrón de división definido en etapas más avanzadas. Este tejido también se mantuvo en medio SH sin reguladores del crecimiento y al igual que el tratamiento anterior, las estructuras identificadas son muy similares a etapas tempranas de embriogénesis somática como puede compararse con tejido de *Musa* spp (Figura 10 D-F).

En el presente trabajo, el “callo” de *Pouteria sapota* mantiene un crecimiento muy lento, además mostró también diferentes características en un mismo tejido generado, pues hubo zonas de color amarillo, las cuales se observaron ligeramente nodulares y compactas. Otras secciones del “callo” tenían un color crema-blanquecino de apariencia compacta y superficie lisa. Ningún “callo” fue de color verde por lo que suponemos que no se generó un tejido organogénico. Sin embargo, no podemos descartar que los niveles endógenos de auxina en el explante sean altos y estén actuando de manera sinergista para la formación de este tipo de “callo” con apariencia embriogénica

Tiempos largos de desarrollo se han observado en cultivos de especies como el durazno (Scorza *et al.*, 1990), en donde se utilizaron tiempos de inducción de 6 meses para lograr un callo embriogénico. De manera similar en *Clemantis integrifolia* x *C. viticella* se dio la formación de embriones globulares después de 18 meses de cultivo a partir de un callo friable y de color claro (Mandergaran y Sieber, 2000).

Aunque se utilizaron explantes provenientes de individuos silvestres y de individuos cultivados, la variabilidad genotípica aparentemente no afecta su competencia para la formación de "callo", pues aunque se reporta que los individuos silvestres presentan mayor variabilidad genética. Se observó sin embargo que proporcionalmente responden más explantes de frutos silvestres que de los cultivados, aunque la respuesta en estos ensayos se da siempre en medio SH en presencia de 0.5 mg/l de BAP . Se sabe que el cultivo de endospermo con bajas concentraciones de auxina induce la formación callo embriogénico e incluso se reporta al 2,4-D como la auxina más efectiva para la inducción de callo embriogénico (Bartók y Sagui. 1990; Kin *et al.*, 1990; Sehgal y Abbas, 1996). Los resultados obtenidos en el presente trabajo indicaron que el 2,4-D no fue promotor de tejido embriogénico en mamey, pues los explantes tratados con 2,4-D no respondieron al estímulo ni en combinación con BAP. Llama la atención que sea solamente el BAP el que generó "callo", pues se sabe que esta hormona dirige la diferenciación del tejido hacia la formación de órganos. Sehgal y Abbas (1996) obtuvieron la formación de 4 tipos de callo al cultivar endospermo de *Mallotus philippensis* en medio MS + 3mg/l BAP + caseína hidrolizada. El callo regenerado presentó color verde friable o compacto después de ser subcultivado durante 24 meses. Posteriormente, al ser cultivado en medio con BAP+ANA (0.2 mg/l) y glutamina se expresó la formación de brotes después de 12 semanas. Se ha observado la formación de callo embriogénico de sándalo (*Santalum album*) en medio adicionado con BAP (Bapat y Rao, 1984), de igual manera se obtuvo callo morfogenético en la especie comercial *Morus alba*, en medio MS adicionado con BAP (5µM), sin embargo, Sankara y colaboradores (1996) consideran que esta hormona no es la más efectiva para la inducción de callo embriogénico. Se reporta la acción sinergista entre estos compuestos y otros componentes orgánicos del medio, como son el jugo de tomate, agua de coco y extracto de levadura (Thomas *et al.*, 2000).

En el presente estudio hay que recordar que los dos medios de cultivo contenían 15% de agua de coco por lo que no se descarta que aquí también se esté dando un efecto sinérgico entre la concentración baja de BAP y el agua de coco. La respuesta generada en cada explante probado (hoja, embrión y endospermo) es diferente de acuerdo a los estímulos externos, tanto a los componentes del medio de cultivo como a los reguladores del crecimiento. Con hoja se formó callo en medio Litz con bajas concentraciones exógenas de 2,4-D, y en el endospermo se formó en medio SH con la aplicación exógena de BAP, en ambos explantes los reguladores del crecimiento se aplicaron en cantidades bajas. Esto evidencia el estatus fisiológico de cada tejido, pues uno es un tejido ya diferenciado y el otro es un tejido nutritivo así que los dos explantes presentan diferentes balances hormonales.

6.5 Cultivo de embriones

Se usaron frutos de entre 30 a 40 mm de diámetro, se observó que el tamaño del embrión varió considerablemente, debido probablemente al grado de desarrollo en el que se encontraba la semilla.

Los embriones se encontraban en distintas etapas al momento de su extracción de la semilla: siendo inicialmente translúcidos, se tornan color crema en los primeros 5 días de cultivo, y ligeramente amarillos después de 10 días; al llegar a 20 días de cultivo, los embriones tenían un color verde. Se observaron también cambios en el tamaño del embrión. Los cotiledones aumentaron en volumen. En los embriones globulares más pequeños se observó el aumento del volumen junto con una coloración verde, pero en aquellos embriones que ya habían superado la etapa globular mostraron aumento de volumen desigual para ambos cotiledones, pues un cotiledón permaneció más pequeño que el otro. La mayoría de los explantes llegó hasta esta etapa y posteriormente se detuvo el crecimiento: se

tornaron blancos y posteriormente se oscurecieron sin que se manifestara alguna respuesta morfogénica (Figura 11A-B).

Los resultados obtenidos en embriones fueron escasos, pues de 30 explantes sembrados sólo en 5 se observó una respuesta, 3 explantes en medio SH + 2 mg/l BAP, 1 explante en medio SH + 0.5 mg/l BAP y 1 explante en medio Litz + 2 mg/l de 2,4-D.

En los cotiledones tratados con BAP se dió la formación de estructuras globulares tanto en el área del hipocótilo como en la superficie de los cotiledones. Estas estructuras globulares presentaron apariencia seca y compacta con muy lento crecimiento (Figura 11 E-F). El registro de esta respuesta fue más lento que en el endospermo; se observó definida a los 120 días (4 meses) de cultivo y no derivó en ninguna otra respuesta morfogénica. Estructuras similares se han encontrado en explantes de tallo de *Manilkara zapota* (*Achras sapota*) (Sachdeva y Mehra, 1986), óvulos de *Carica papaya* (Litz y Conover, 1983), embriones de *Acacia mangium* (Xie y Hong, 2001), foliolos de *Ceratozamia euryphyllidia* (Chávez *et al.*, 1998) y en diferentes explantes de distintas especies del género *Citrus* (Gosal *et al.*, 1995) de las cuales derivaron cultivos embriogénicos.

Los explantes en el experimento control no tuvieron respuesta morfogénica, sólo un explante control mostró la formación de un cuerpo globular en el área del meristemo apical de brote, sin el progreso de su desarrollo (Figura 11 C).

El explante tratado con 2,4-D presentó la formación de callo en el área cercana al meristemo apical en el embrión. El crecimiento del callo separó los dos cotiledones y sólo en uno se mantuvo este crecimiento. Sin embargo no se observó la formación de ninguna estructura diferenciada (Figura 11D).

Para utilizar al embrión como un explante con potencial embriogénico, es necesario determinar qué etapa de su desarrollo es la más susceptible de inducir una respuesta, además es necesario identificar el tamaño de fruto que contenga al embrión en el estado fisiológico y de desarrollo deseado, pues aparentemente la

respuesta será diferente en embriones globulares que en embriones maduros. En ningún embrión se observó la germinación *in vitro*, lo que puede indicar la importancia que tiene el endospermo en la regulación del desarrollo y germinación del embrión en esta especie y de las condiciones específicas que requieren para germinar y que hasta el momento no se han logrado bajo las condiciones de cultivo *in vitro*.

Para todos los explantes probados es evidente que la especie *Pouteria sapota* contiene características tanto anatómicas como fisiológicas, que hacen difícil su propagación vegetativa, ya sea por métodos tradicionales ó por cultivo de tejidos. Es necesario que se realicen estudios biológicos para poder comprender cuales son las principales características y los principales factores que deben considerarse para lograr exitosamente la reproducción vegetativa por cultivo de tejidos. La falta de información en general, sobre la especie, es un reto que debe superarse para poder plantear estrategias de aprovechamiento que hagan del mamey una alternativa nutricional y de sustento económico para las comunidades locales y de mayores ingresos para huertos comerciales nacionales.

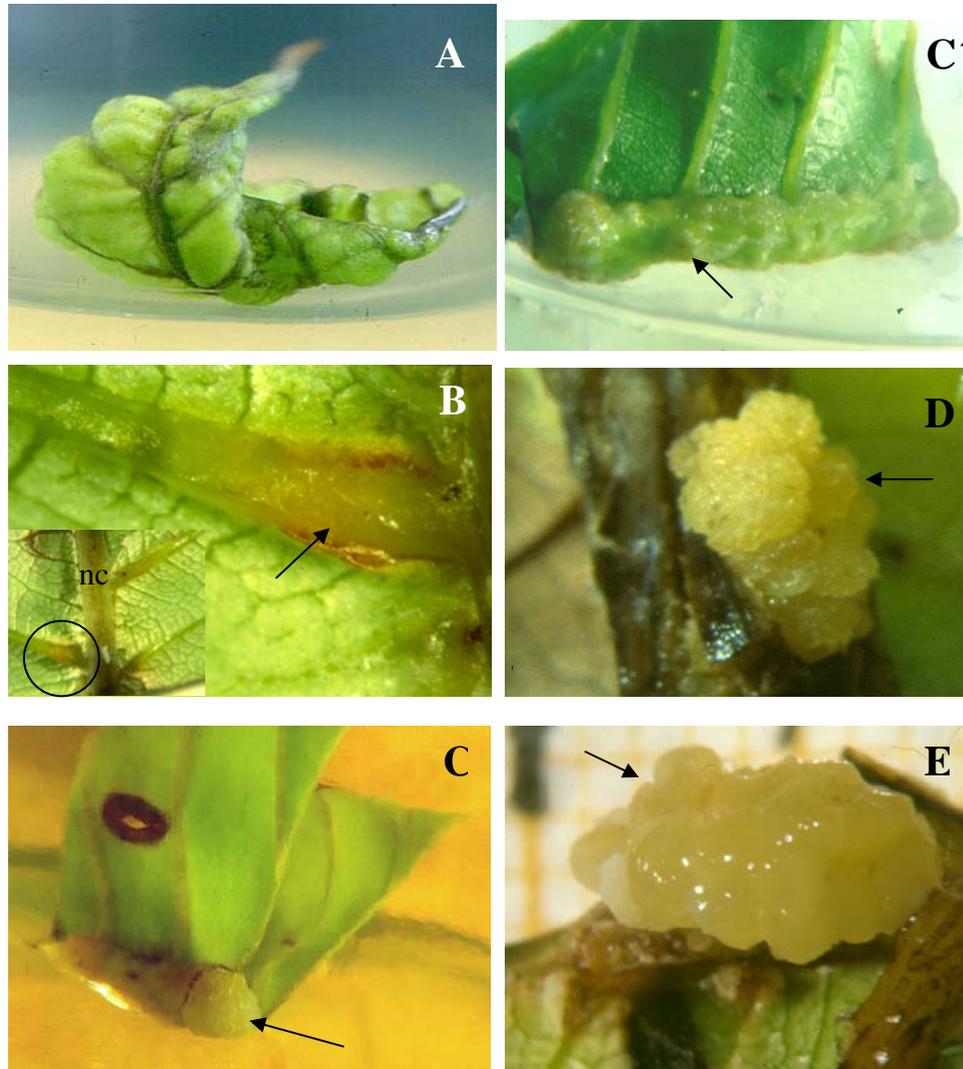


Figura 3. Respuesta morfo genética inducida en explantes de hoja de *Pouteria sapota* a los 60 días de cultivo. **A)** Explante con curvatura cóncava en relación al medio de cultivo, con lámina de apariencia rugosa color verde claro (medio Litz sin reguladores del crecimiento), **B)** Nervadura lateral de un explante (recuadro), la flecha indica el aumento de volumen, no hay formación de tejido (medio SH sin reguladores del crecimiento) **C)** Nervadura verde de apariencia rugosa o nodulosa color claro, con formación de callo nodular en el área de corte, callo de apariencia esponjosa (Medio SH+2,4-D 0.5mg/l, **C')** Nervadura central con formación de zonas nodulares de color mas claro que dan a la superficie de la nervadura una apariencia rugosa; **D)** Nervadura central de aspecto fibroso, completamente oscura, con engrosamiento y formación de callo esponjoso ligeramente verde-amarillento (medio Litz+2,4-D 0.5mg/l); **E)** Nervadura con formación de callo de apariencia nodular y superficie húmeda (medio Litz + 2,4-D 2mg/l).

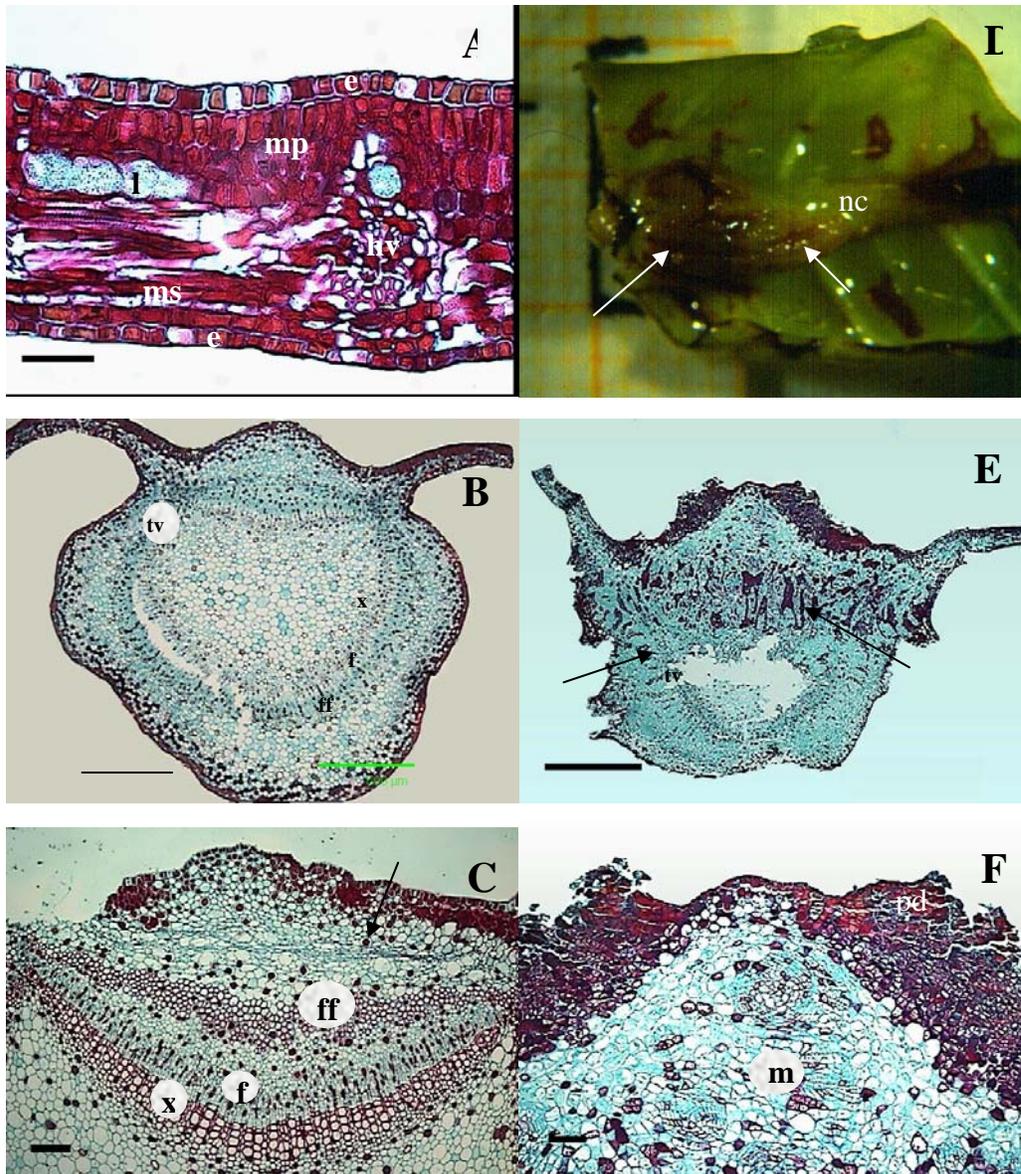


Figura 4. Anatomía de la hoja de *Pouteria sapota* y cambios morfoanatómicos promovidos por el cultivo *in vitro*. **A-C** hoja fresca sin tratamiento. **A)** Corte transversal de lámina; **B)** Corte transversal de la nervadura central (nc) en donde se observa el cordón vascular continuo; **C)** Corte transversal. de nc, zona adaxial de la nervadura central con presencia de taninos condensados; **D- F)** Explante cultivado 44 días en medio Litz + 2,4-D 0.2mg/l, **D)** Nervadura central con engrosamiento en un extremo. **E)** Corte transversal de nc. Las flechas señalan la pérdida de continuidad del cilindro vascular e hileras de células nuevas con taninos; **F)** Región adaxial de la nc con presencia de alta actividad mitótica y diferenciación *de novo* de puntos meristemáticos concéntricos y peridermis; epidermis (e), floema (f), fibras floemáticas (ff), haces vasculares menores (hv), laticíferos (l), meristemos concéntricos (mc), mesófilo en empalizada (mp), mesofilo esponjoso (ms), nervadura central (nc), peridermis (pd), tejido vascular (tv), xilema (x). (Barras: A=50 μ m; B=500 μ m; C=100 μ m; E=1000 μ m; F=100 μ m.)

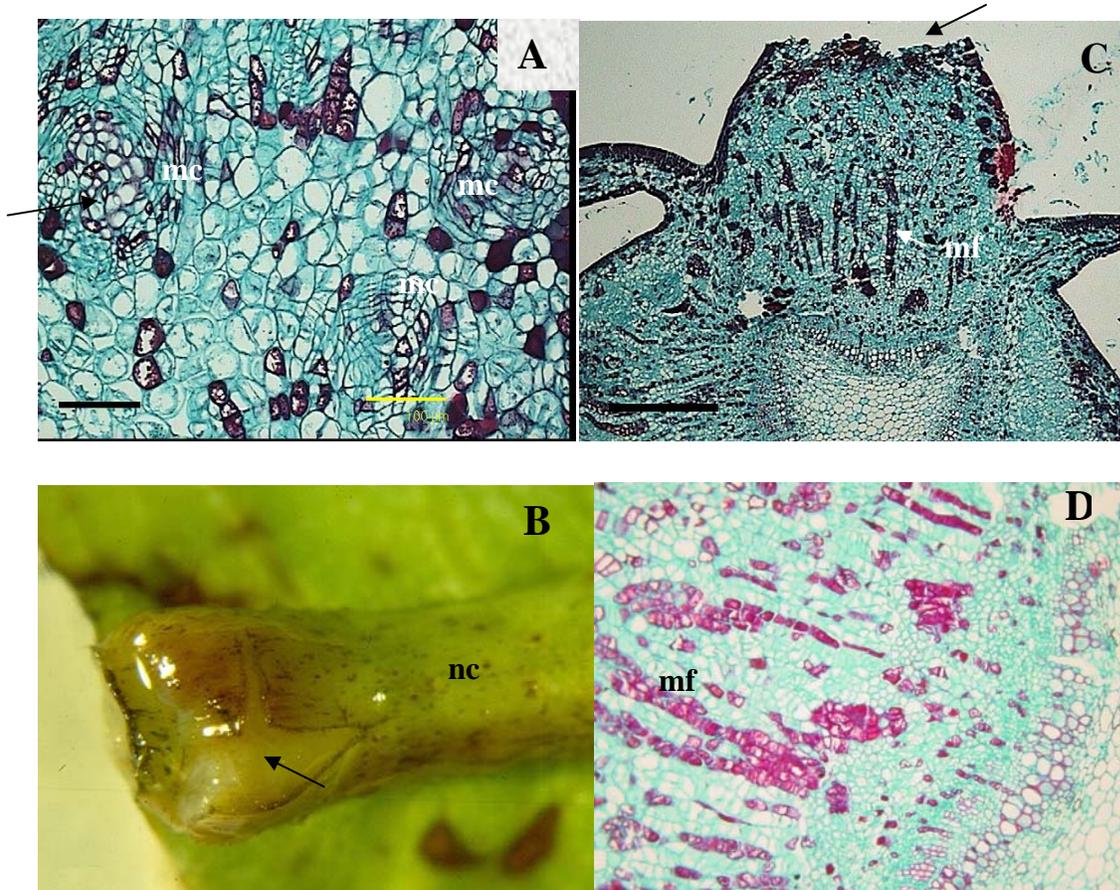


Figura 5. Cambios morfoanatómicos de la hoja promovidos por el cultivo de tejidos. **A)** Explante cultivado 44 días en medio Litz + 2,4-D 0.2mg/l; Región adaxial con zonas meristemáticas concéntricas, flecha señala la formación de haces vasculares jóvenes; **(B-D)** Explante cultivado 45 días en medio Litz + 0.5 mg/l de 2,4-D **B)** Explante con engrosamiento en nervadura central; **C)** Región adaxial de la nervadura central, se observa la formación de meristemas en fila. La flecha señala el rompimiento de la epidermis y estratos subepidérmicos; **D)** Zona adaxial de nervadura central con meristemas

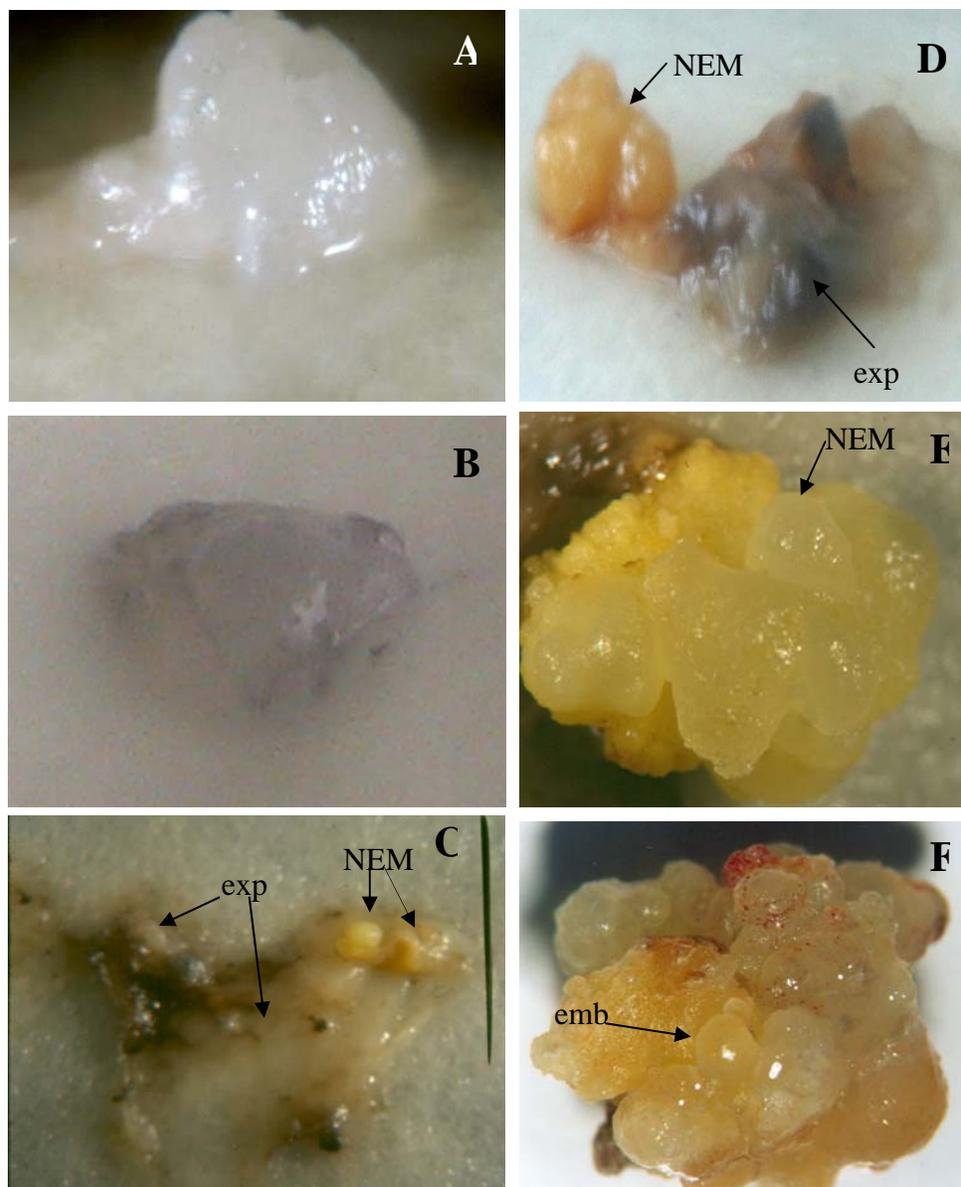


Figura 6. Cambios morfológicos presentados por el endospermo en el medio SH + BAP 0.5 mg/l **A)** Endospermo fresco (explante inicial); **B)** endospermo con 5 días de cultivo; **C)** Inicio de morfogénesis en endospermo a los 30 días de cultivo, se observa el explante inicial color oscuro y un extremo con formación de tejido nuevo que posteriormente dará origen a los NEM; **D)** Formación de callo a los 60 días de cultivo, la flecha indica el explante inicial; **E)** callo nodular semicompacto con 6 meses de cultivo, formación nódulos embrioidales; **F)** Callo nodular 15 meses de cultivo, se observan estructuras semejantes a embriones en etapa globular (embrioides); embrioides (emb); explante inicial (exp); nódulos embrioidales (NEM)..

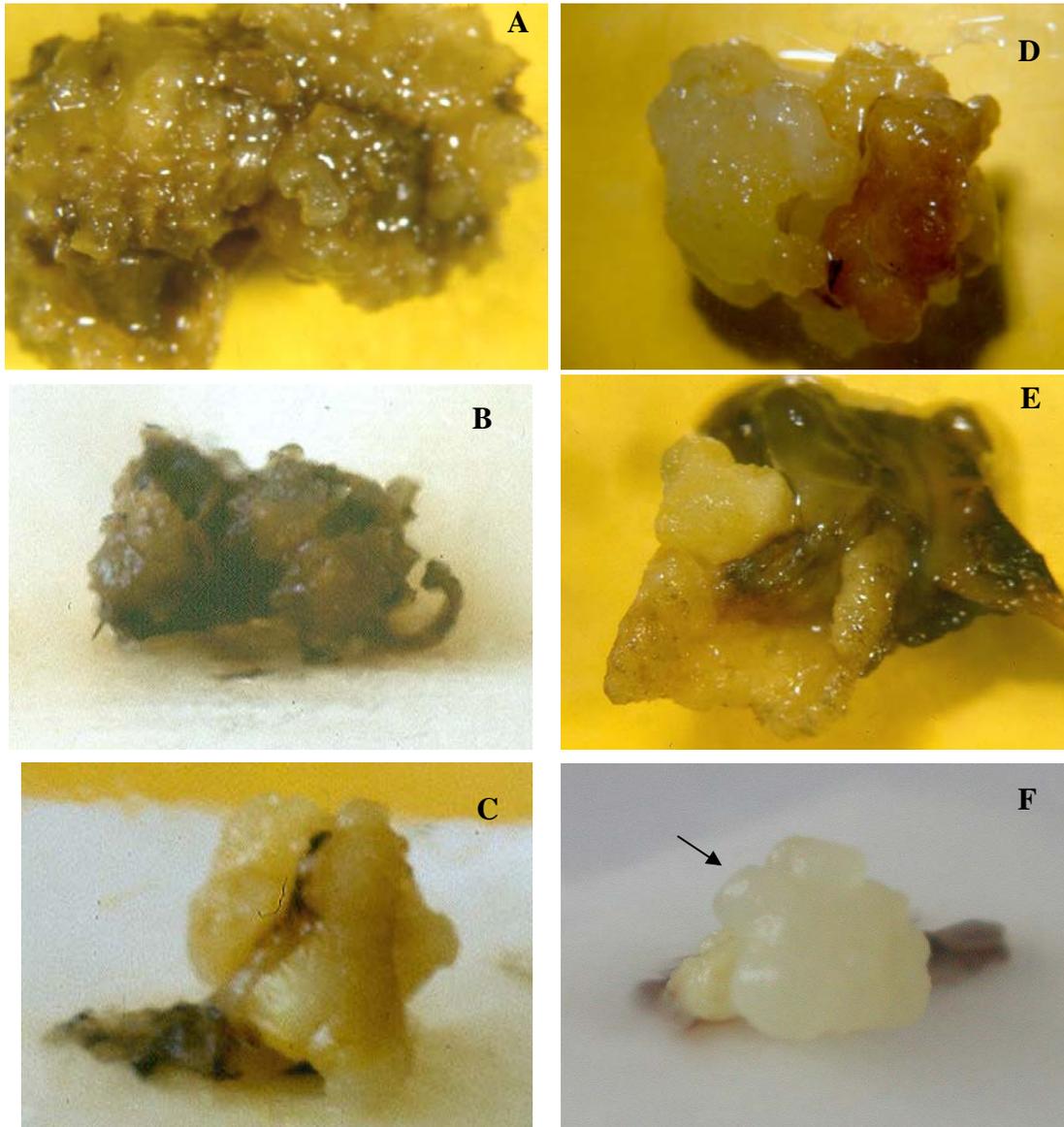


Figura 7. Respuesta morfológica presentada en explantes de endospermo cultivados en medio Litz y SH con reguladores del crecimiento. **A.** Callo café claro ligeramente friable (Litz+2,4-D 0.5mg/l); **B.** Callo café oscuro y compacto (Litz+2,4-D 2mg/l), **C.** Callo compacto y liso de color amarillo (SH sin reguladores del crecimiento); **D.** Callo compacto amarillo claro o anaranjado con regiones de la base color rojizo (SH+BAP 2mg/l), **E** Callo compacto color amarillo claro superficie ligeramente rugosa (SH +2,4-D 0.5mg/l); **F** Callo compacto color blanco ligeramente amarillento con estructuras ligeramente globulares (SH BAP 0.5 mg/l).

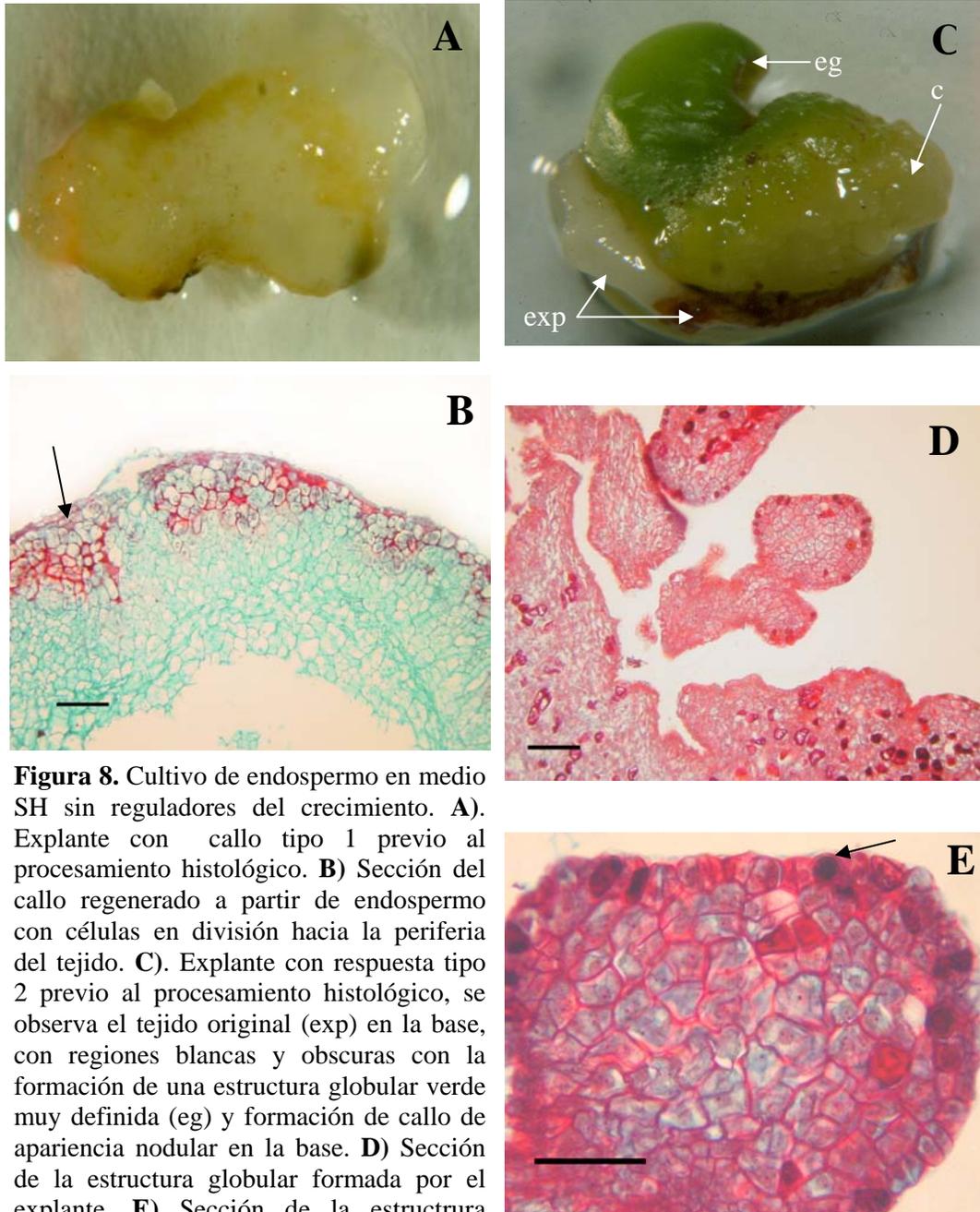


Figura 8. Cultivo de endospermo en medio SH sin reguladores del crecimiento. **A).** Explante con callo tipo 1 previo al procesamiento histológico. **B)** Sección del callo regenerado a partir de endospermo con células en división hacia la periferia del tejido. **C).** Explante con respuesta tipo 2 previo al procesamiento histológico, se observa el tejido original (exp) en la base, con regiones blancas y oscuras con la formación de una estructura globular verde muy definida (eg) y formación de callo de apariencia nodular en la base. **D)** Sección de la estructura globular formada por el explante. **E)** Sección de la estructura globular en mayor aumento en donde se observan células en activa división y la presencia de taninos; estructura globular (eg), explante (exp), callo (c). Escalas (B), (D) y (C) =100 μ m.

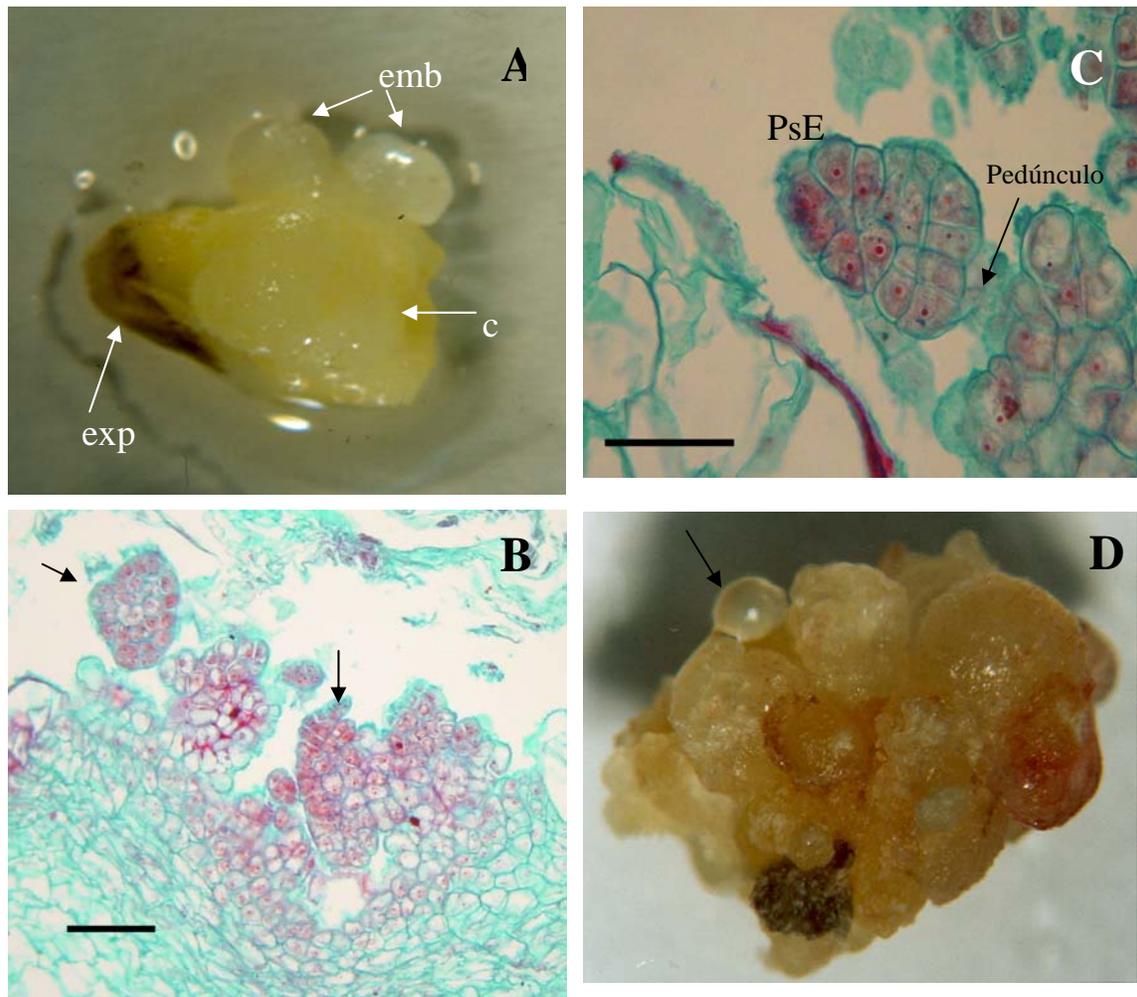


Figura 9. Estructuras nodulares regeneradas a partir de endospermo en medio SH + BAP 0.5 mg/l a los 95 días en medio de inducción. **A)** Apariencia externa del explante y tejido regenerado antes del proceso histológico, se distingue un callo compacto y la formación de estructuras globulares en la superficie (embrioides). **B)** Corte histológico del callo con evidencia de una alta actividad meristemática. **C)** Pseudoembrión con pedúnculo. **D)** Masa pro-embriogénica después de 14 meses con estructuras globulares. **E)** Corte longitudinal de masa pro-embriónica regenerada después de 14 meses de cultivo. Explante original (exp), embrioides (emb), callo (c), pseudoembrión (PsE) Escalas: (B, E y F) = 100µm; (C) = 50 µm.

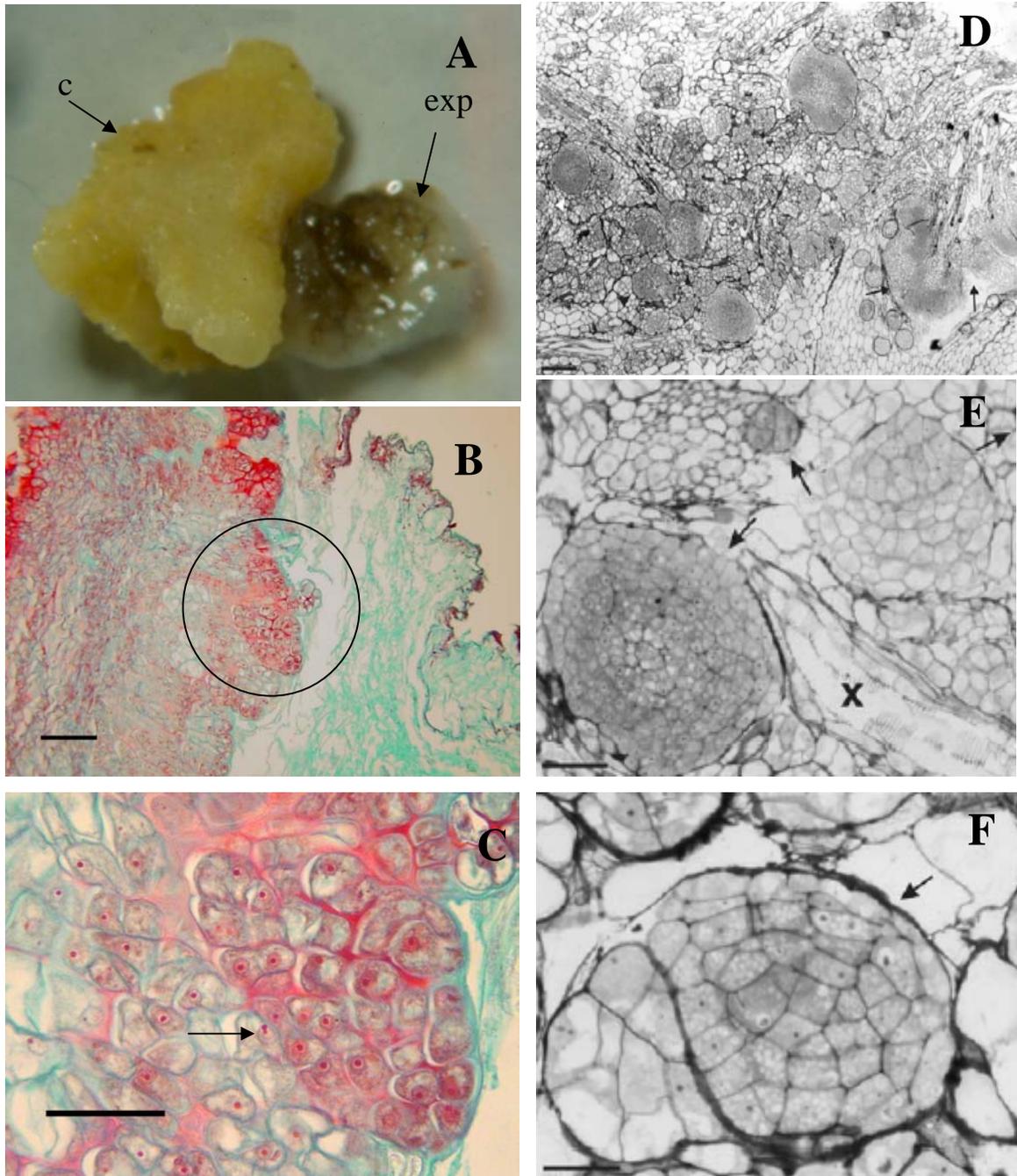


Figura 10. Explante cultivado en medio SH + 2mg/l Bap **A)** Apariencia del explante previo al tratamiento histológico. **B)** Corte transversal del callo regenerado. **C)** Células meristemáticas concéntricas en el callo. **D-F)** Tejido embriogénico de *Musa* spp. Con regiones pro-embriogénicas de alta actividad mitótica. (Tomada de Balbão *et al.*, 2001). Escalas: **(B)**=100µm; **(C)**=50µm.

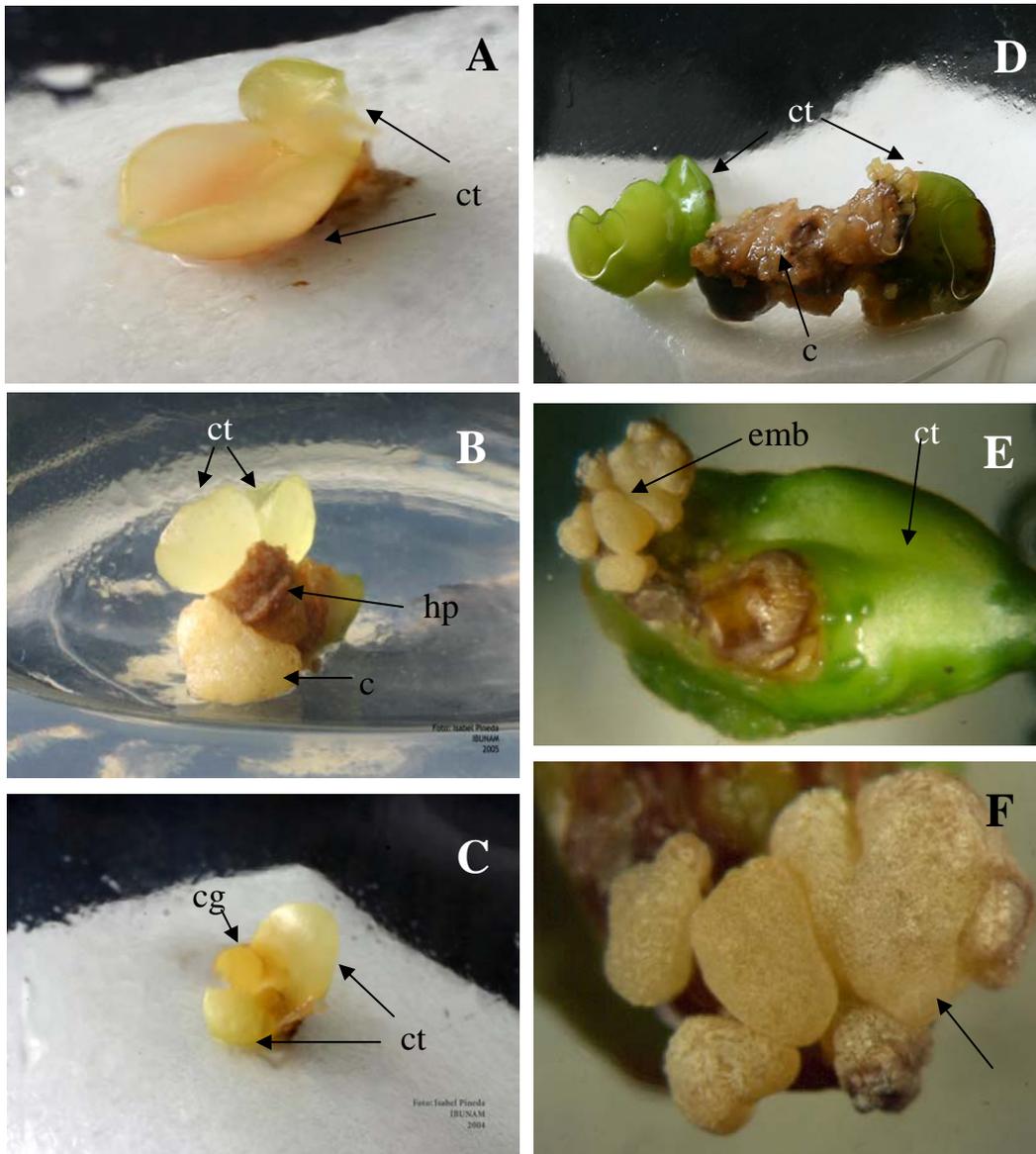


Figura 11. Respuesta morfogénica en embriones inmaduros. **A)** Embrión con 20 días de cultivo, crecimiento desigual de los cotiledones; **B)** Formación de callo a partir del hipocótilo, embrión con 3 meses de cultivo en medio SH sin reguladores del crecimiento; **C)** Embrión cultivado en medio SH + 2,4-D 0.5mg/l. con la formación de un cuerpo globular en el área del meristemo apical de brote; **D)** Embrión con 3 meses de cultivo en medio SH sin reguladores de crecimiento; **E)** Embrión con 4 meses de cultivo en medio SH + 0.5 mg/l Bap con la formación de estructuras globulares en un extremo cotiledonar; **F)** Estructuras globulares formadas en el cotiledón de un embrión inmaduro; callo (c), cotiledones (ct), cuerpo globular (cg), embrioides (emb), hipocótilo (hp)

7. CONCLUSIONES

7.1 Para todos los explantes.

1. La desinfección adecuada de las hojas y los frutos para su establecimiento *in vitro* es con cloro comercial 20% v/v durante 20 a 25 minutos.
2. El polivinilpirrolidona (PVP) 2.5 mg/l es efectivo para evitar la fenolización de los explantes de *P. sapota*.

7.2 A partir de explantes de hojas.

1. La hoja de mamey no responde uniformemente a los tratamientos en toda su estructura, la inducción de callo resulta solamente a partir de la nervadura central más cercana al peciolo. La lámina foliar no es competente para la inducción morfogénica.
2. El medio Litz + 2,4-D (0.2 y 0.5 mg/l) induce la formación de callo en la nervadura central de las primeras hojas explandidas de *Pouteria sapota*.
3. El medio Litz + 2,4-D (0.2mg/l) promueve la formación *de novo* de puntos meristemáticos concéntricos y de haces vasculares jóvenes, en la región subepidérmica abaxial de la nervadura central más cercana al peciolo de las hojas de *Pouteria sapota*.
4. Los tratamientos de inducción con auxina y citocinina combinadas, resulta inhibitoria en la inducción de alguna respuesta morfogénica en explantes de hoja.
5. Los resultados presentados en este proyecto son los únicos registrados a nivel internacional para *P. sapota* con la obtención de callo con competencia organogénica.

7.3 A partir de endospermo.

1. La formación de tejido a partir de endospermo se logra sólo en una porción específica de éste. Es necesario ubicar la porción del endospermo que es factible de responder a la inducción morfogénica.
2. El medio SH adicionado con agua de coco y 0.5 mg/l de BAP induce la formación de estructuras de apariencia embriogénica (nódulos embrioidales), a partir de endospermo de semillas inmaduras provenientes de frutos con diámetros de 30 - 40 mm.
3. El medio SH adicionado con agua de coco y 0.5 mg/l de BAP promueve la formación de grupos de células con arreglo concéntrico que presentan una polaridad típica embrionaria.
4. El análisis histológico demostró que el tejido generado deriva en la formación de etapas tempranas de embriones globulares, sin la diferenciación de un protodermo en el cuerpo del embrión.

7.4 A partir de embriones zigóticos.

1. La inducción de respuestas morfogénicas en embriones zigóticos de mamey no fue posible en los medios probados en este estudio.
2. Es necesario buscar el estado de desarrollo de los embriones que permita la inducción morfogénica.

9. ANEXOS

Medio Litz

Reactivo	gramos/ litro
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.134
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.250
KNO_3	2.5
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.150
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.150
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.01689
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.0086
H_3BO_3	0.0062
KI	0.00083
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.00025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.000025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.000025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.0278
$\text{Na}_2 \text{EDTA}$	0.0373
Tiamina * HCl	0.0001
Ac. Nicotínico	0.0005
Piridoxina * HCl	0.0005
Inositol	0.10
Glicina	0.002
L- Glutamina	400
Hidrolizado enzimático de caseína	0.100
L-Arginina	0.100
L-Asparagina	0.100
Acido ascórbico	0.100
Sacarosa	60

Medio Shenk y Hildebrand (1972)

Reactivo	gramos/ litro
KNO ₃	2.5
MgSO ₄ • H ₂ O	0.4
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.3
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.2
MnSO ₄ • H ₂ O	0.02
H ₃ BO ₃	0.005
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.001
KI	0.001
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.0002
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0.0002
CoCl ₂ • 6H ₂ O	0.0002
Tiamina HCl	0.005
Acido Nicotínico	0.005
Piridoxina HCl	0.0005
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.015
Na ₂ EDTA	0.02
Myo-Inositol	0.05

Adhesivo de cromo

Reactivo	Porcentaje
Gelatina	0.5
Fenol	0.1
Alumbre de cromo (CrK(SO ₄) ₂ 12 H ₂ O)	0.05 (disuelto en agua)

10. Literatura consultada

- Almeyda N. y F. W. Martin. 1979. "Frutas tropicales: El mamey sapote". *Agricultura de las Americas*. Febrero: 8-34.
- Aloni, R. 1995. "The induction of vascular tissue by auxin and cytokinin". In: *Plant Hormones and their Role in Plant Growth Development*. 2nd edit. P. J. Davies (Ed.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands, pp. 531-546.
- Alvarado, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: *Propagación y Mejora genética de plantas por Biotecnología*. Pérez Ponce (ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba.
- Anderson W. C. 1980. Tissue culture propagation of red raspberries. In: *Proceedings of the Conference on Nursery Production of Fruit Plants through Tissue Culture- Applications and Feasibility* (pp 27.34) April 21-22, 1980. U.S: Dept Agr., Res. Results, ARR-NE-11, Beltsville, MD.
- Antonelli, M. and P. Druart. 1990. The use of a brief 2,4-D treatment to induce leaf regeneration on *Prunus canescens* Bois. *Acta Horticulturae* 280: 45-50.
- Ayensu E. S. 1972. "Morphology and anatomy of *Synsepalum dulcificum* (Sapotaceae)". *Botanical Journal of the Linnean Society*. 65:179-187.
- Balarama, S. Y. and V. Padmaja. 2003. Shoot organogenesis and plantlet regeneration from leaf segments of *Pigeonpea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 73: 197-200.
- Balbão F., S. B. Appezzato-da-Glória, A. Pinheiro, M. Rodriguez. 2001. "Histological changes in banana explants, cv. Nanicão (*musa* spp., group aaa), submitted to different auxins for induction of somatic embryogenesis". *Revta Brasil. Bot, Sao Paulo*. (24) 4: 595-602.
- Bapat, V. A. and P. S Rao. 1984. Regulatory factors for *in vitro* multiplication of sandalwood tree (*Santalum album*, L) I. Shoot bud regeneration and somatic embryogenesis in hypocotyl cultures. *Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)* 93: 19-27.
- Bartók, T., And F. Sági. 1990. A new endosperm-supported callus induction method for wheat (*Triticum aestivum* L.) *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 22: 37-41.
- Bilkey, P. C., B. H. McCown and A. C. Hildebrandt. 1978. Micropropagation of African Violet from petiole cross-sections. *Hortscience*. 13 (1): 37-38.
- Biohoua, A. and L. Bonneau. 1999 "Control of *in vitro* somatic embryogenesis of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) by the sugar type and the osmotic potential of the culture medium". *Plant Cell Reports*. 19: 185-190.
- Biondi S. and T. A. Thorpe. 1981. Clonal propagation of forest tree species. In *Proc. Costed Symp. On Tissue Culture of Economically important plants*. Ed. Rao, A.N. Singapore.
- Blake, J. and R. Hornung. 1995. Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.) In: *Somatic Embryogenesis in woody plants*. Kluwer Academic Publishers. Vol. 2: 327-340.
- Bonal, D.; Monteuis, O. 1997. *Ex vitro* survival, rooting and initial development of *in vitro* rooted vs unrooted microshoots from juvenile and mature *Tectona grandis* genotypes. *Silvae Genet*. 46: 301-306.
- Bonga, J. M., and P. Von Aderkas. 1992. *In vitro* culture of Trees. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Caboni E., M.G., Tonelli, P. Lauri, S.D. Angeli, and Damiano. 1999. *In vitro* shoot regeneration from leaves of wild pear. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 59: 1- 7.
- Campbell, C. W. and S. P. Lara. 1982. "Mamey sapote cultivars in Florida". *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 95: 114-115.

- Campbell, C. W. and S. P. Lara. 1992. Propagation of the mamey sapote. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 105: 276-278.
- Coenen C., y Lomax, T. 1997. Auxin-cytokinin interactions in higher plantas. Old problems and new tools. *Trends in plant science*. Vol. 2. 9: 351-356.
- Castillo B., A. A. L. Smith. 1997. Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracilis* explants. *Plant Cell Report.* (16) 6: 385-388.
- Casarrubias G. M., M. Delgado, J. Vara, E. Suárez y A. Rascado. 2001. "Propagación *in vitro* de Maracuyá (*Pasiflora edulis* var. *Flavicarpa*) utilizando diferentes concentraciones de auxinas- citocininas y giberelinas. Memorias de Congresos: IX SOMECH, XLVII ISTH , VII AMEHOAC. 87.
- Ceniza, M. S., S. Ueda, Y. Sugimura. 1992. *In vitro* culture of coconut endosperm: callus induction and its fatty acids. *Plant Cell Reports*. 11: 546-549.
- Chávez, V. M., R. E. Litz, J. Marquez. 1995. Histology of somatic embryogenesis of the cycad *Ceratozamia mexicana* var. *Robusta* (Miq.) Dyer. *Plant Science*. 191-200.
- Chavez, V. M., R. E. Litz, M. Monroy, P. A. Moon and A. M. Vovides. 1998. Regeneration of *Ceratozamia euryphyllidia* (Cycadales, Gymnospermae) plants from embryogenic leaf cultures derived from mature-phase trees. *Plant Cell Reports*. 17:612-616.
- Coenen C., y Lomax, T. 1997. Auxin-cytokinin interactions in higher plantas. Old problems and new tools. *Trends in plant science*. Vol. 2. 9: 351-356.
- Davenport, T. L., J. T. O'Neal. 2000. "Flowering and fruit set of mamey sapote [*Calocarpum sapota* (Jacq.) Merr.] cv. Magaña in South Florida. *Scientia Horticulturae* 83: 61-70.
- Dodds, J and L. Roberts. 1995. *Experiments in Plant Tissue Culture*. 3^{ed}. Cambridge University Press. USA.
- Donnelly, D. J. And W. E. Vidaver. 1988. Glossary of Plant Tissue Culture. Cambridge University Press. Cambridge. 178 p.
- Dunstan, D. I., T. E. Tautorius and T. A. Thorpe. 1995. "Somatic Embrogenesis in Woody Plants" In: *In vitro* Embryogenesis in Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p. 471-541.
- Durzan, Don J. 1990. Molecular Phenogenetics as an aid to fruit breeding. *Acta Horticulturae: in vitro Culture and Horticulturnl Breeding*. 280: 547-556.
- Esau, K. 1977. *Anatomía Vegetal*. Edit. Omega. Barcelona, España. pp. 151-158
- Fahn, A. 1979. "Secretory Tissues in Plants". Academic Press Inc. New York. 287 p.
- Fasolo F., and S Predieri. 1990. Cultivar dependent responses to regeneration from leaves in apple. *In vitro Culture and Horticultural Breeding Acta Horticulturae* p. 280.
- Fay M. F. And J. Gratton. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation?. *Biold. Cons.* 3: 176-183.
- Fay, M. F., and J. Gratton. 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation al Kew. *Bradleya* 10: 33-48.
- Figueira, A and J. Janick. 1995. Somatic embryogenesis in cacao (*Theobroma cacao* L.) In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. (Eds)Jain, S., Gupta & Newton, R. Kluwer Academic Publishers. 2: 1-21. Netherlands.
- Gangopadhyay, G., Gangopadhyay, S. B., R. Gupta, S. Mukherjee, K. K. 2003. Micropropagation of *Tectona grandis*: assesment of genetic fidelity. *Biol. Plant* 46: 459-461.
- García Campusano, F. T.A. 1999. Inducción de brotes y enraizamiento a partir del cultivo *in vitro* de embriones maduros de *Pseudotsuga macrolepis* Flous. *Tesis de licenciatura en Biología Agropecuaria*. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala. México.

- Garg L, N.N. Bhandari, V. Rani, S. S. Bhojiwani. 1996. Somatic embryogenesis and regeneration of triploid plants in endosperm cultures of *Acacia nilotica*. *Plant Cell Rep.* 15: 855-858.
- George E.F., Sherrington P. D. 1988. "Plant propagation by Tissue Culture; Handbook and Directory of Commercial Laboratories". Exergetics Ltd. Edington.
- George, E. F. 1993. *Plant Propagation by tissue culture: The technology*. 2nd Ed. Exergetics Limited. England.
- Goldfarg, B. Howe, W. P. Hackett and O. Moteuuis. 1996. Survival an Growth of eastern white pine shoot apical meristems *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Org. Cult.* 46: 171-178.
- Gosal, S.S., M.I.S. Gill and H. S. Grewal. 1995. Somatic embryogenesis in *Citrus* species. In: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. (Eds) Jain, S., Gupta & Newton, R. Kluwer Academic Publishers Vol. 2, 1-21. Netherlands.
- Graham J., R. McNicol. 1990. Plantlet regeneration and genetic transformation in soft fruit species. *Acta Horticulturae: In vitro Culture and Horticultural Breeding*. 280: 517-522.
- Guohua Ma and Qiusheng Xu. 2002. Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoots from immature leaves of cassava. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 70: 281 - 288.
- Hagio. T. 2002. Adventitious shoot regeneration from immature embryos shoot of sorghum. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 68: 65-72.
- Huang, Z. G., Y. L. Huangpu and L. Y. Xu. 1983. Triploid plantlets from endosperm culture of Chinese gooseberry. *Kexue Tongbao* 4: 247-250.
- Hutchinson, J. F. 1981. Tissue Culture Propagation of Fruit Trees. In: *Tissue Culture of Economically Important Plants*. Eds. Rao, A. N. *Proceedings of the International Symposium held at the Botany Department, National University of Singapore*. UNESCO p: 113-120.
- Ipekci, Z And N. Gozukirmizi. 2004. Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and internode explants of *Paulownia elongata*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 79: 341-345.
- Jiménez González, E. 1998. Cultivo de Ápices y Meristemas. En: *Propagación y Mejora genética de plantas por Biotecnología*. Pérez Ponce (ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba.
- Jiménez Rodríguez, J. A. 2002. Inducción de respuestas morfogénicas *in vitro* en *Magnolia dealbata* Zucc. y *M. Grandiflora* L. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Jordan M., and E. Oyanedel. 1992. Regeneration of *Pouteria lucuma* (Sapotaceae) plants *In vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 31: 249-252.
- Judd E. 2002. *Plant Systematics*. Sinauer, USA.
- Kim S.W., D.S. In, T.J. Kim & J.R. Liu. 2003. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in petiole and leaf explant cultures and petiole-derived embryogenic cell suspension cultures of *Hylomecon vernalis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 74: 163-167.
- Kim, S. W, In D.S., Tae K. H. and Liu J.R. 2005. Somatic embryogenesis and plant regeneration in leaf and petiole explant cultures and cell suspension cultures of *Pinellia tripartita*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 80: 267-270.
- Kin, M.S., L. Fraser and C. Harvey. 1990. Initiation of callus and regeneration of plantlets from endosperm of *Actinidia* interespecific hybrids. *Scientia Horticulturae*. 44: 107-117.
- Kintzios S., J. B. Drossopoulos, Ch. Lymperopoulos. 2001. Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 67: 55-62.

- Litz R., P. Moon, H. Mathews, S. Jayasankar, M. Joy Monsalud and F. Pliego-Alfaro. 1995. Somatic embryogenesis in mango (*Mangifera indica* L) In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Kluwer Academic Publishers. Vol. 2, 341-356. printed in Netherlands
- Litz R. 1986. Effect of Osmotic Stress on Somatic Embryogenesis in *Carica* Suspension Cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111(6): 969-972.
- Litz R. E. 1988. Somatic embryogenesis from Cultured Leaf Explants of the Tropical Tree *Euphoria longan* Strend. *Plant Physiol.* Vo. 132 pp. 190-193.
- Litz R. E., V. M. Chávez and P. A. Moon. 1998. Induction of embryogenic cultures from mature-phase tropical and subtropical trees and control of somatic embryo maturation and germination. *Recent advances in biotechnology for tree conservation an management proceeding of an IFS Workshop.* International foundation for Science. 232-243.
- Litz R. y Conover A., 1983. High-frecuency Somatic Embryogenesis from *Carica* Suspensión Cultures. *Ann. Bot.* 51: 683-686.
- Lloyd G. and B. McCown. 1981. Commerdially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. *Comb. Prop Intl. Plant prop. Soc.* 30: 421-427.
- Mandegaran A. and V. K. Sieber. 2000. Somatic embryogenesis in *Clemantis integrifolia* x *C. viticella*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 62: 163-165.
- Manzanila-Ramírez, M. A., M. M. Robles-G, V. M. Medina-U y S. Guzmán-G. 2001. Inducción de embriogénesis somátca en tres genotipos de mango (*Mangifera indica* L). Memorias de Congresos: SOMECH, XLVII, VIII AMEHOAC. México. 95-96.
- Marchant R., M. R. Davey, J. Lucas. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Floribunda rose (*Rose Hybrid* L.) cvs. Trumper and Glad Tidings. *Plant Sci.* 120 (2): 95-105.
- Mascareñas, P. K. Gupta, V. M. Kunkarni, Urmil Mehta, R. S. Lyer, S. S. Khuspe and V. Jagannathan. 1981. Proc. COSTED Symp. *On Tissue Culture of Economically Important Plants.* Singapore, 1981. Ed. A. N. Rao.
- Mascarenhas, A. F.; Khuspe, S. S. Kundurkar, S. V. 1993. Micropropagation of teak. In: Ahuja, M. R., ed. *Micropropagation in woody plants.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 247-262.
- Merkle, S. A. W. A. Parrot and B. S. Flinn. 1995. "Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. In: *In vitro Embryogenesis in Plants.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. P. 155-203.
- Merkle, S. y J. Nairn. 2005. Hardwood tree Biotechnology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology.* 41. 5: 602-619.
- Mitrofanova, L. V., O. V. Mitrofanova. 2000. using Broad genetic Diversity and *in vitro* culture to enhance breeding of some subtropical fruti plants. In: Proc EUCARPIA Symp. On Fruit Breed and genetics Eds. M. Geibel, M. Fischer and C. Fischer. In: *Acta Hort.* 538.
- Morera J. A. 1994. "Sapote mamey (*Pouteria sapota*)" In: *Neglected crops:1492 from a different perspective.* Hernando Bermejo, J. E y J. León (eds). Plant production and Protection Series No. 26. FAO. Rome, Italy p:103-109.
- Murashige T and F. Skoog. 1962. A revised medium medium or rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plat.* 15: 472- 497.
- Nava-Cruz, Y., M. Ricker. 2004. El Zapote Mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. Moore y Stearn], un fruto de la selva mexicana con alto valor comercial. En: M. N. Alexiades y P. Shanley (editores). *Productos forestales, medios de subsistencia y conservación: estudios de caso sobre*

- sistemas de manejo de productos forestales no maderables* (Volumen 3 – América Latina), pp. 43-62. Center for International Forestry Research (CIFOR), Bogor, Indonesia.
- Nieves N., J. Lorenzo, M. Blanco, J. Gonzáles, H. Peralta, M. Hernández, R. Santos, O. Concepción, C Borroto, E. Borroto, R. Tapia, M. Martínez, Z. Fundora and A. González. 1998. Artificial endosperm of Cleopatra tangerine zygotic embryos: a model for somatic embryo encapsulation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 54: 77-83.
- Nitsch j. P. And C. Nitsh. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 1963: 85-87.
- Ogden, M. A. H. 1984. "Factor affecting the graft union of mamey sapote (*Calocarpum sapota* (Jacq.) Merr.)" PhD Diss., Univ. of Florida, Gainesville.
- Pennington T. D. 1990. *Flora neotrópica. Monograph 52 Sapotaceae* Edit. The New York Botanical Garden. New York. USA.
- Pennington T. D. Y Sarukán J. 1998. "Arboles Tropicales de México" 2a edición. Edit. UNAM, Fondo de Cultura Económica. México.
- Purohit, S. D., A. Singhvi. 1998. Micropropagation of *Achras sapota* through enhanced axillary branching. *Scientia Horticulturae* 76: 219-229.
- Purohit, S. D., G. Kukda, P. Sharma, K. Tak. 1994. *In vitro* propagation of an adult tree *Wrightia tometosa* through enhanced axillary branching. *Plant Science* 103, 67-72
- Ramsundar, V., J. B. M. Md. A. 1986. Khader. "Studies on rootin of sapota cuttings". *South Indian Horticulture*. (34) 1: 41-43.
- Rangan, T. S. 1993. Clonal Propagation of *Citrus*. *Plant Tissue Culture Manual* C7: 1 -18.
- Rangaswamy, N. S. 1981. Nucellus as an experimental system in basic and applied tissue culture research. In: Rao, AN (Ed.) *Proc COSTED Symp on Tissue Culture of Economically Important Plants*, pp 269-286, Singapore.
- Rao K. S., N. K. Chrungoo and A. Sinha. 1996. Characterization of somatic embryogenesis in sandalwood (*Santalum album* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 32: 123-128.
- Rao N. S. 1982. *Tissue cultre of economically importan plants*. Costed and ANBS (Asian Network for Biological Sciences. UNESCO 307 p.
- Rasai, S., A. P. George, A. S. Kantharajah. 1995. "Tissue culture of *Annona* spp. (Cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): A review". *Scientia Horticulturae* 62: 1-4.
- Romero Hernández, J. A. 2005. "Anatomía del fruto y semilla de mamey [*Pouteria sapota* (Jacq) H. E. Moore & Stearn]. Tesis para obtener el título de Biólogo. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca. México. 67p
- Ricker, M. , R. O Mendelsohn, D. C. Daly, and G. Ángeles. 1999. Enriching the rainforest with native fruit trees: an ecological and economic analysis in Los Tuxtas (Veracruz, Mexico) *Ecological E conomics*. 31: 439-448.
- Ricker, M., D. C. Daly. 1998. *Botánica económica en bosques tropicales: principios y métodos para su estudio y aprovechamiento*. Editorial Diana, México D. F., México. 293 p.
- Rugini, E., Muganu, M. 1998. A novel strategy for the induction and maintenance of shoot regeneration from callus derived from established shoots of apple (*Mallus x Domestica* Borkh) cv. Golden Delicious.
- Sachdeva, Saroj y P. N. Mehra. 1986. *In vitro* studies on *Achras sapota* (Chikoo); callus and early embryogenesis. *Phytomorphology*. 36(3,4). 315-324.
- Saenz, L., L. H. Jones, C. Oropeza, D. Vácil and M. Strnad. 2003. Endogenous isoprenoid and aromatic cytokinins in different plant parts of *Cocos nucifera* (L.). *Plant Growth Regulation* 39: 205-215.

- Salcedo Gomez, J. G. 1985. "Propagación vegetativa del mamey (*Calocarpum sapota* (Jacq.) Merr.)". Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias: especialista en fruticultura. Colegio de postgraduados. Chapingo, México.
- Sankara Rao, K, Chrungoo, N. K., Amares Sinha. 1996. Characterization of somatic embryogenesis in sandalwood (*Santalum album* L.). *In Vitro Cell. and Dev. Biol. Plant.* 32: 129-135.
- Schwendiman, J., C. Pannetier and N. Michaux-Ferrière. 1990. Histology of embryogenic formations during in vitro somatic embryogenesis of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. *Oléagineux* 45: 409-418.
- Scorza, R., J. M. Cordts, and S. Mante. 1990. Long-Term Somatic embryo production and plant regeneration from embryo-derived peach callus. *Acta Horticulturae* 280: 183-190.
- Sebánek, J., Z. Sladký, S. Procházka, M. Kutáček, M. Luxová, O. Erdelská. 1991. *Experimental Morphogenesis and Integration of Plants: Developments in Crop Science* 18. Elsevier. Czechoslovakia.
- Sehgal, C.B., Syed Abbas. 1996. Induction of triploid plantlets from the endosperm culture of *Mallotus philippensis* Mkuell. ARG. *Phytomorphology*, 46(3) 283-289.
- Shenk, R. U. Y A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and technique for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.
- Shrivastava, N. M. Rajan. 1999. Múltiple shoot regeneration and tissue culture studies on *Bacopa monnieri* (L.) Pennell. *Plant Cell Reports.* 18: 919-923.
- Soh, Woong-Young and S. S. Bhojwani. 1999. "Morphogenesis in plant tissue cultures". Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Sponsel, Valerie. 1995. The biosíntesis and Metabolism of Gibberellins in higher plants. In: *Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Peter Davies (Ed). Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Sreelata N., M. V. Shirgurkar and A. F. Mascarenhas. 1986. Studies on endosperm culture of *Annona squamosa* Linn. *Plant Cell Reports.* 5: 132-135.
- Sudharsan, C., M. AboEl-Nil and J. Hussain. 2004. Tissue culture technology for the conservation and propagation of certain native plants. *Journal of Arid Environments* 54: 133-147.
- Sul, IW. And S.S. Korban. 1998. Influence of bombardment with Bacoated microprojectiles on Shoot organogenesis from *Phlox paniculata* L. and *Pinus pinea* L. tissues. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* 34: 300 302.
- Steeves, T. A and Sussex, I. M. 1989. *Patterns in plant Development* Cambridge University Press. Cambridge.
- Te-Chato S., Lim, M. 2000. Plant regeneration of mangosteen via nodular callus formation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 59: 89-93.
- Thomas, D. T., Bhatnagar, A. K., S.S. Bhojwani. 2000. Production of triploid plants of mulberry (*Morus alba* L) by endosperm culture. *Plant Cell Reports.* 19: 395 399.
- Thorpe, T. A., I. Harry, P. P. Kumar. 1991. Application of micropropagation to forestry. In: *Micropropagation*. Debergh and R. H. Zimmerman (eds). 311-336.
- Tiwari, S. K., Siril, E. A., Tiwari, K. P. 2002. An improved micropropagation protocol for teak. *Plant Cell Tiss. Organ Culture.* 71: 1-6.
- Wang, D., Yao-lin Gui, Jiang-san Sun. 1988. Tissue Culture of Fruit Crops in China. *HortScience.* 33 (6).962-965
- Wang, Y-H and P. L. Bhalla. 2004. Somatic embryogenesis from leaf explants of Australian fan flower, *Scaevola aemula* R. Br. *Plant Cell Rep.* 22:408-414.

- White P.R. 1963. *The cultivation of animal and plant cells*. 2nd edition. Ronald Press, New York.
- Wildi, E., W., W Schaffner, K. B. Buter. 1998. *In vitro* propagation of *Petasites hybridus* (Asteraceae) from leaf and petiole explants and from inflorescence buds. *Plant Cell Rep.* 18: 336-340.
- Williams, E. G. and G. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot. Lond.* 57: 443-462.
- Xie, D. Y., Y. Hong. 2001. Regeneration of *Acacia mangium* Through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports.* 20: 34-40.
- Yeung, Edward. 1995. Estructural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: *in vitro embryogenesis in plants*. Ed. Trevor A. Thorpe. Kluwer Academic Publishers. 205-248.
- Yu, G. 1982. Shoot tip culture of adult tree of *Crataegus pinnatifda*. *Plant Physiol. Commun.* 4:43.
- Ziv, Meira. 1999. Developmental and structural patterns of *In vitro* plants. In: *Morphogenesis in plant tissue cultures*. Woong-Young, S and S. Bhojwani (Eds). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. P 235-254.
- Zuker, A. A. Ahroni, H. Shejtman, A. Vainstein. 1997. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of *Gypsophila paniculata* L. *Plant Cell Reports* 16: 775-778.

8 COROLARIO

Aún cuando el presente trabajo se encuentra distante en la obtención de plantas completas, ofrece los primeros resultados que marcan la pauta para cumplir este objetivo, sin embargo la perspectiva para cumplirlo es a mediano o largo plazo, pues el crecimiento que presenta la especie es muy lento, y la disponibilidad de material biológico susceptible a la inducción morfogenética, está limitado por su ciclo biológico. Es necesario realizar más experimentos que prueben otros reguladores del crecimiento en los explantes de hoja y endospermo aquí propuestos.

El cultivo de *Pouteria sapota* fue difícil por varias razones:

- 1) La disponibilidad de tejido joven a lo largo del año, pues sólo se encuentra en crecimiento activo durante 3 meses al año, de los cuales, el estado de hoja joven con potencial de respuesta sólo se mantiene las primeras semanas.
- 2) La disponibilidad del fruto joven (con endospermo abundante) tanto en individuos silvestres como en las huertas, es importante encontrar el tamaño del fruto que esté asociado con la presencia de endospermo abundante para poder cultivarlo y por otro lado con la etapa de desarrollo del embrión para encontrar una correlación entre el estado de desarrollo del embrión y su competencia morfogenética.
- 3) El bajo porcentaje de regeneración presentada en los explantes probados y el crecimiento lento del tejido regenerado.
- 4) La escasa o nula información existente de cultivo de tejidos sobre esta especie.

El presente estudio es sólo el inicio de mayores esfuerzos por lograr la propagación *in vitro* de esta especie, la cual comienza a tener mayor importancia a nivel mundial.

Es importante que recordemos que el desarrollo de protocolos de regeneración *in vitro* en especies leñosas se ha caracterizado, en su mayoría, por ser difícil de lograr.

Los protocolos existentes hasta la fecha, han sido la culminación de muchos trabajos de investigación previos, que además, se han llevado a cabo durante muchos años en diferentes instituciones a nivel mundial, tal es el caso de la manzana, el mango, el durazno, y el limón entre otras.

Como estudiante de maestría mi mayor preocupación es que la información generada sea útil para los futuros trabajos sobre ésta especie y se logre finalmente el planteamiento de una estrategia multidisciplinaria para el aprovechamiento sustentable de lo que podría convertirse en un fruto de cultivo mayor.