



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

REGENERACIÓN DE MELÓN (*Cucumis melo* L.)
BAJO CONDICIONES *in vitro* COMO
MODELO BIOLÓGICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
TECUIXPO MAGDALENA RAMOS RODRÍGUEZ



DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. MARÍA TERESA OLIVERA FLORES

- 2006 -



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

1. Datos del alumno.

Ramos
Rodriguez
Tecuixpo Magdalena
55 85 94 27
Universidad Nacional Autonoma de Mexico
Facultad de Ciencias
Biologia
096358759

2. Datos del tutor

M en C
Maria Teresa
Olivera
Flores

3. Datos del sinodal 1

Dra
Guadalupe Judith
Marquez
Guzman

4. Datos del sinodal 2

Biol
Oscar
Trujillo
Mendoza

5. Datos del sinodal 3

M en C
Josefina
Herrera
Santoyo

6. Datos del sinodal 4

Dra
Clara
Esquivel
Huesca

7. Datos del trabajo escrito

Regeneración de melón (*Cucumis melo* L.) bajo condiciones in vitro como modelo biológico
106 p
2006

A G R A D E C I M I E N T O S

Al laboratorio 116 de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Química por las facilidades otorgadas en el desarrollo de esta investigación, a la M. en C. María Teresa Olivera por guiarme en todo el proceso y a la bióloga María de Jesús por sus asesoría en el montaje del experimento.

Al laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias por toda la disposición de sus integrantes en el trabajo que se realizó, principalmente a la Dra. Judith Márquez por su guía en la elección e interpretación de imágenes, a la M. en C. Lourdes López C. y a la Dra. Clara Esquivel H. por la asesoría en la parte técnica.

Al Dr. Gómez Lim por proporcionar las semillas para montar el experimento.

Al laboratorio de Microcine por la asesoría, obtención y mejoramiento de las imágenes del análisis histológico, en especial a la Maestra Ana Isabel Buler, al Maestro Alejandro Martínez Mena y a los Biólogos José Antonio Hernández y Alfredo Gamboa.,

A Efraín, fotógrafo profesional de la Facultad de Química por las fotografía del cultivo de tejidos.

Al H. Comité revisor por todos sus comentarios, todos ellos pertinentes, y constructivos par el éxito de este proyecto, mil gracias, Josefina Herrera, Clara Esquivel, Oscar Trujillo, Judith Márquez y Mayte Olivera.

A G R A D E C I M I E N T O S

A Dios por haberme permitido vivir, por darme fuerza interior, por su presencia en todo momento, por que siempre que formule una pregunta encontré en el una respuesta o un camino que seguir, por permitirme estar sana y cumplir este sueño, por tener a mi lado a los cinco seres que más amo.

A mis papás, por haberme permitido vivir, por el largo y difícil camino que tuvieron que forjar, para que yo este aquí, por su interminable amor, seguridad, confianza y paz, que siento a su lado día a día.

Papá gracias por ser el hombre que eres, por enseñarme que la vida no es fácil pero que esta llena de alegría y optimismo que siempre hay que enfrentarla con la cara muy en alto, siempre con fortaleza y seguridad, por ser un luchador invencible.

Mamá gracias por enseñarme a amar, a respetarme a mi y a los demás, a ser constante y no flaquear, a creer en Dios y en los demás, a entender que es maravilloso tener una familia y trabajar día a día por ella.

Pau, hermanita, gracias por crecer conmigo, por haber jugado a las muñecas y al té, por ser mi cómplice y amiga incondicional por tus palabras de aliento en todo momento, por tu apoyo que no tiene precio, por ser la mejor hermana y amiga, juro que no hay quien te supla.

Tuco, hermanito, gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme, por ser mi hermano pequeño, por crecer a mi lado y ser parte de nuestra bella familia.

Osito, gracias por darle a mi vida el sabor de dulce, limón y sal, por que tu compartiste todo el proceso desde el principio hasta el final, por cargar libros, hacer tareas, por ayudarme con todo lo que estuviera a tu alcance y a tu no alcance, por tu invaluable sonrisa de todos los días, por los sándwiches de pollo y el atún con verduras, por atreverte a armar sueños conmigo y mejor aun a realizarlos a mi lado.

Gracias por tu inmenso amor y dedicación, gracias por darle significado y explicación a lo que siente mi corazón.

A G R A D E C I M I E N T O S

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme acogido dentro de muchas de sus instalaciones, por haberme permitido tener educación, diversión y actividades recreativas, por conocer a un sin número de personas y dejar en mí los colores azul y oro.

A la Facultad de Ciencias, a sus instalaciones, bibliotecas, profesores y personal que ahí labora, por haberme formado como bióloga y conocer a la mayoría de mis mejores amigos.

Al laboratorio 116, CTV, por acogerme por muchooooo tiempo, a Mayte por todo tu apoyo y por confiar en mí, a Jorge Ramírez por todo lo que me enseñaste y por tener siempre disposición, además de los buenos ratos que pasamos con Erik, que siempre tuviste la disposición para ayudarme, gracias a los dos por haber hecho tan amena la estancia, Al resto de los compañeros: Cristal, Innan, Mauricio, Aida, Lorena, Ivon, Celeste y Rosa, por los buenos momentos de trabajo y por ser agradables compañeros.

A todos los que laboran en el lab. de Desarrollo en Plantas por su disposición para ayudarme, por su saludo siempre amable, especialmente a la Dra. Judith por creer en mí y estar siempre disponible, a la Maestra Lulú por todo, todo lo que me enseñó, por su trato siempre paciente y amistoso al igual que el de la Dra. Clarita.

A Jose por sus comentario enriquecedores y por sus palabra de animo. A Eurípides y Victor por su ayuda.

A Tania y Jazmín por ser mis amigas desde hace más de 10 año, es un gusto compartir con ustedes parte de esto.

A Nadia por compartir parte de este proceso, por tu amistad y alegría.

A Memo, Eugenia, Rosario, Mónica, Miriam, Amanda, Rocío y Miguel por que en diferentes momentos compartimos cursos, exámenes, tareas, desvelos, risas, alegrías y tristezas, por que lo largo de este proceso siempre tuvieron una palabra de aliento y estuvieron pendientes hasta el final, gracias amigos por haber dejado en mí una huella imborrable.

A la familia Velázquez Lucio por su ayuda y apoyo en especial a Juan por la asesoría técnica y a Victor mi cuñadito, por la tecnología prestada, mensajes de aliento y por estar al pendiente de todo esto.

A mis abuelos Jorge, Juana^t y Magdalena por permitirme ser su descendiente, por los invaluable padres que me dieron y por sus palabras de aliento.

A mi tía Tere Barsenas por sus consejos, auxilia, palabras y actos que me fortalecieron.

A Xanat, porque aunque no expresa sus sentimientos, siempre me hizo compañía en las largas noches de estudio, ahuyentando el miedo y el silencio de la noche.

A Lupita y Oscarito por su incondicional amistad, por toda las tardes llenas de comida, pláticas, risa y revisión, por la disposición para ayudarme, por animarme a continuar, por permitirme adentrarme en su vida e involucrarme y no solo a mí sino también a Horacio. Gracias por que cuanto los conocí de verdad mi concepto de amigos cambio, ¡¡MIL GRACIAS!!

A todos los que tuvieron una palabra de aliento y que aunque no están sus nombres están presentes. Ya los que creyeron siempre en mí y a los que no también, es un poco tarde pero aquí esta.

*Dedicada a los cinco seres que rigen mi vida, por ser el centro
de mi universo, por hacer latir mi corazón día con día:*

*A Jaime: por haberme enseñado a luchar por lo que quiero y
jamás ser derrotada.*

*A Lety: por enseñarme a amar, a ser paciente y ordenada en el trabajo,
a mirar siempre hacia donde brilla el sol.*

*A Paulina: por permanecer a mi lado derecho, por ser hermana, amiga,
compañera de juegos y de sueños.*

*A Jaime A.: por permanecer a mi lado izquierdo, por ser mi hermano,
por tu ayuda y tu paciencia siempre silenciosa.*

A Horacio: por ser mi cómplice, defensor, impulsor y aliente.

*Sin su existencia mi vida no sería lo que es hoy,
Eternamente gracias.*

Tecuixpo

ÍNDICE

	Págs.
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA.	5
2.1. <i>Cucumis melo</i> L var. <i>inodorus</i> Naudi tipo honey dew.	5
2.1.1. Clasificación Taxonómica y descripción de la especie.	5
2.1.2. Tipo: Gota de miel (honey dew).	7
2.1.3. Características de cultivo.	8
2.1.4. Importancia económica.	9
2.1.5. Valor nutricional.	10
2.2. El Cultivo de Tejidos Vegetales.	10
2.3. Regeneración <i>in vitro</i> .	13
2.3.1. Embriogénesis somática.	14
2.3.2. Organogénesis.	16
2.4. Regeneración <i>in vitro</i> de <i>C. melo</i> L.	18
2.5. Modelos biológicos.	23
2.5.1. El melón como modelo biológico para la transformación genética.	25
3. OBJETIVOS	28
4. HIPÓTESIS	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1. Ruta Crítica.	30
5.2. Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de <i>Cucumis melo</i> L. var. <i>inodorus</i> tipo honey dew y su regeneración.	32
5.2.1. Material biológico.	32
5.2.2. Aspectos generales.	32
5.2.3. Germinación de semillas bajo condiciones asépticas.	33

5.2.4.	Establecimiento de callos inducción y proliferación; regeneración y enraizamiento de brotes.	34
	Ensayo 1. Inducción y proliferación de callos.	34
	Ensayo 2. Inducción, proliferación y cinética de crecimiento de callos. Regeneración y enraizamiento.	37
5.3.	Análisis histológico de nudos, callos y brotes de <i>Cucumis melo</i> L. var. <i>inodorus</i> tipo honey dew provenientes del cultivo <i>in vitro</i> .	38
5.3.1.	Elección de muestras provenientes del cultivo <i>in vitro</i> .	39
5.3.2.	Procesamiento de muestras.	39
5.3.3.	Obtención de cortes, laminillas. y observación en el microscopio óptico.	40
6.	RESULTADOS.	41
6.1.	Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de <i>Cucumis melo</i> L. var. <i>inodorus</i> tipo honey dew y su regeneración.	41
6.1.1.	Germinación de semillas bajo condiciones asépticas.	41
6.1.2.	Establecimiento de callos, inducción y proliferación; regeneración y enraizamiento de brotes.	42
	Ensayo 1. Inducción y proliferación de callos.	42
	Ensayo 2. Inducción, proliferación y cinética de crecimiento, de callos. Regeneración y enraizamiento	49
6.2.	Análisis histológico de nudos, callos y brotes de <i>Cucumis melo</i> L. var. <i>inodorus</i> tipo honey dew provenientes del cultivo <i>in vitro</i> .	57
6.2.1.	Obtención e interpretación de cortes histológicos.	57
7.	DISCUSIÓN.	63
8.	CONCLUSIÓN.	79
9.	ANEXOS.	81
10.	BIBLIOGRAFÍA.	100

ABREVIATURAS

Medios de cultivo

- MS: Medio nutritivo creado por Murashige & Skoog (1962)
- Myt: Medio MS modificado por Olivera Flores (1996)b
- SH: Medio nutritivo Schenk y Hildebrandt (1972)

Reguladores de crecimiento

- 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- ABA: Ácido abscísico
- AIA: Ácido 3-indolacético
- AG₃: Ácido giberélico
- BAP: 6-bencilaminopurina
- Cin: Cinetina. 6-furfurilaminopurina

Concentración

- μM : Micromolar
- mM: Milímolar
- μmol : Micromol
- M: Molar
- N: Normal

Longitud

- mm: Milímetros
- cm: Centímetros
- cm^2 : Centímetros cuadrados
- m^2 : Metros cuadrados

Tiempo

- hrs: Horas
- min: Minutos
- s: Segundos

Peso

- μg : Microgramos
- mg: Miligramos
- g: Gramos
- kg: Kilogramos

Volumen

- ml: Mililitros
- l: Litros

Otros

- $^{\circ}\text{C}$: Grados Celsius
- dH_2O : Agua desionizada
- pH : Potencial de hidrógeno
- NaOH: Hidróxido de sodio
- HCl: Ácido clorhídrico

RESUMEN

Esta investigación, se llevó a cabo en dos etapas, la primera consistió en el desarrollo de la morfogénesis *in vitro* de *Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naudi tipo honey dew, para la cual se probaron cinco tratamientos consecutivos de desinfección de semillas, evaluando diferentes soluciones químicas y antibióticos en diferentes tiempos y concentraciones; ya estériles se sembraron en medio MS. Para la inducción de callo se probaron tres medios de cultivo: MS-II, Myt y SH y cuatro explantes: hoja, pecíolo, entrenudo y nudo, obtenidos de plántulas de 8 semanas de edad. Los cuatro explantes inoculados en los tres medios indujeron callo; los cuales se evaluaron tomando en cuenta porcentaje de proliferación, coloración, apariencia, oxidación y capacidad regenerativa. La investigación se continuó con el explante de nudo cultivado en los medios MS-II y Myt, en los cultivos de este explante, la cinética de crecimiento evidenció una desdiferenciación y rediferenciación más rápida debido a los meristemos axiales presentes en él.

La cinética de crecimiento reveló que el medio MS-II es el más exitoso para el desarrollo de callo organogénico, mostrando que la concentración de 1.5 mg l^{-1} de AIA y 6 mg l^{-1} de Cin son una combinación excelente para su proliferación, de igual forma arrojó datos relevantes en la inducción de brotes, ya que el medio MS-II produjo 22 brotes, más que el medio Myt que produjo 13. Los brotes provenientes de ambos medios, se sembraron en medio MS adicionado con AIA (MS-III) para estimular la formación de raíces, lo cual se logró en su totalidad.

El análisis histológico se realizó con tres tejidos provenientes del cultivo *in vitro*: explante de nudo de 8 semanas de edad (T_0), callo de entre 6 y 10 semanas de siembra (T_1) y callo con un inicio de formación de brote de 10 a 15 semanas de siembra (T_2).

En T_0 , se demostró la presencia de meristemos axilares en el nudo y células con actividad mitótica. En T_1 se identificaron estructuras típicas, formas celulares heterogéneas con grandes vacuolas centrales, citoplasma pequeño, núcleo prominente con la presencia de nucleolo. Por último en T_2 se observó un desarrollo de organogénesis indirecta, formación de zonas meristematicas con primordios foliares, presencia de haces vasculares, estructuras radicales y posiblemente el desarrollo de embriones somáticos.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia de las Cucurbitáceas, existen especies útiles para el hombre, ya que son fuente de alimento, de fibra y de algunos objetos domésticos. En la República Mexicana, existen Cucurbitáceas importantes, una de ellas es el melón (*Cucumis melo* L.), el cual es relevante, tanto por la superficie dedicada a su cultivo como por ser generador de divisas y empleos en el área rural (Zapata *et al.*, 1989; Maroto, 1994 y Espinoza, 2002).

Son varios los modelos biológicos que hasta el momento son utilizados, dentro de estos destacan el tabaco, la arábido, la zanahoria y el maíz, sin embargo, poco han estudiado al melón, a pesar de que esta especie presenta características que le permiten ser un buen modelo biológico, tales como: ciclo de vida corto, crecimiento rápido con fácil control, genoma pequeño, ($n=12$, $2n=24$) importancia económica, plasticidad en las respuestas morfogénicas, células totipotenciales y capacidad de proporcionar abundante biomasa (Hernández, 2003).

En el presente trabajo se planteo como objetivo general, establecer cultivos *in vitro* de *C. melo*, con la capacidad de inducción y proliferación de callo, además de la obtención de plántulas, por medio de la organogénesis, todo ello se corroboró con el análisis histológico. También tiene el interés de mostrar al melón como una especie con todas las características necesarias para ser considerada como un modelo biológico; además de evidenciar, la posibilidad de que pueda utilizarse como futuro modelo de transformación genética, con el interés de producir vacunas para seres humanos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA GENERAL

2.1. *Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naudi tipo honey dew

2.1.1. Clasificación taxonómica y descripción de la especie.

El melón, *Cucumis melo* L. (*Cucumis melo* L. Sp. Pl. 1953) está comprendido dentro de la familia de las Cucurbitáceas con la siguiente clasificación taxonómica según Cronquist en 1988:

Tabla 2.1. Clasificación Taxonómica

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Orden	Cucurbitales
Familia	Cucurbitaceae
Género	<i>Cucumis</i>
Especie	<i>C. melo</i>
Variedad	<i>inodorus</i>
Tipo	honey dew o gota de miel

El melón es una planta herbácea, anual y rastrera que se puede desarrollar en climas templados, cálidos y luminosos, en condiciones de cultivo suele presentar una vegetación exuberante, es de porte rastrero o trepador, con tallos poco consistentes y tiernos, que adquieren su mayor desarrollo en las estaciones secas y calurosas (Zapata, *et al.*, 1989), su ciclo fenológico desde la siembra hasta la fructificación varía de 90 a 110 días y su número cromosómico es $n=12$ ($2n=24$) (Espinoza, 2002).

Raíz. Presenta raíces abundantes y rastreras, algunas llegan a descender hasta un metro de profundidad y en ocasiones todavía mucho más, pero especialmente es entre los 30 a 40 cm de profundidad del suelo donde la planta desarrolla raíces abundantes de crecimiento rápido (Espinoza, 2002; Yaacob, 1995 y www.infoagro.com).

Tallo. Es una planta polimórfica, con tallo herbáceo que gracias a sus zarcillos puede ser rastrero o trepador; está cubierto de tricomas blancos y empieza a ramificarse después de que se ha formado la quinta o sexta hoja (Espinoza, 2002 y Maroto, 1994).

Hojas. Exhiben tamaños y formas muy variables, pudiendo ser enteras, pentagonales o provistas de 3 a 7 lóbulos (Figura 2.1 c). El tamaño varía de acuerdo a la variedad, tiene un diámetro de 8 a 15 cm, son ásperas y cubiertas de vellos blancos, anchas y con un largo pecíolo; pueden mostrar diversas formas como redondeadas, reniformes, acorazonadas, triangulares y pentagonales (Espinoza, 2002; Maroto, 1994 y www.hort.purdue.edu)

Flor. Puede presentar tres tipos de flores: masculinas (estaminadas) y femeninas (postiladas), y hermafroditas. De acuerdo a la presencia de estas flores en la planta, estas pueden ser: andromonoicas, ginomonoicas y trinómonoicas. Las flores masculinas aparecen antes que las hermafroditas, y en grupo de tres a cinco, en los nudos de las guías primarias y nunca donde se encuentra una femenina o una hermafrodita. Las flores pistiladas y hermafroditas aparecen solitarias en los nudos de las guías secundarias. Las flores pistiladas se distinguen de las estaminadas en el abultamiento en su base, que es donde se encuentra el ovario, que si es fecundado, se convertirá en el fruto, las cuales son presentadas en la Figura 2.1 a y b. Las plantas de melón producen más flores estaminadas que hermafroditas. (Maroto, 1994; Raymond, 1999; Yaacob, 1995; Espinoza, 2002).

Fruto. Científicamente se dice que el melón es una baya, provista de abundante semilla, su forma puede ser redonda y ovalada, aplanada por los polos y con dimensiones muy variables. Los frutos alcanzan su madurez, en condiciones favorables de cultivo, a los 45 días de su fecundación, presentando un tamaño muy variable, el cual depende de la variedad (Zapata, *et al.*, 1989)

Semillas. Son muy numerosas de tamaño regular, ovaladas, achatadas y no marginadas (Espinoza, 2002). La producción de semillas es

de 300 kg por hectárea, aunque las mejores producciones pueden alcanzar los 600 kg. El peso de 1 000 semillas es de 25 g aproximadamente.

Las semillas son ricas en aceite, con un endospermo escaso y cotiledones bien desarrollados (Raymond, 1999).



Figura 2.1. *Cucumis melo* L. a) flor masculina, b) flor femenina, c) hojas pentagonales, d) planta, e) tallo y zarcillos, f) frutos, g) fruto en desarrollo y h) semillas (Parson, 1992, www.botany.cs.tamu.edu, www.oaki2.si.gunma-u.ac.jp, www.vegefund.com y www.plantatlas.usef.edu).

2.1.2. Tipo: Gota de miel (honey dew).

En México se siembran únicamente dos variantes botánicas de *Cucumis melo* L.: el *reticulatus* del tipo western y el *inodorus* del tipo honey dew (*Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naudi) (Espinoza, 2002; Cronquist, 1988 y www.mobot.mobot.org), el cual se presenta en la Figura 2.2.



Figura 2.2. Fruto de *Cucumis melo* L. tipo gota de miel (Jamesny, 1997)

Los melones de la variante *inodorus* no son aromáticos como los melones almizcleros y generalmente no se desprenden del pedúnculo. En este grupo se incluye tipos como: casaba, crenshaw, christmas, canarios y gota de miel (honey dew).

Dentro del grupo de melones *inodorus*, el tipo gota de miel es el más importante (Espinoza, 2002). Su tiempo de cultivo es de aprox. 110 días, el fruto es ovalado liso y terso; su cáscara blanca verdosa, cuando madura se vuelve a un color cremoso, el mesocarpo (carnosidad) es totalmente comestible, su sabor es dulce y su color verde claro con algunos tonos naranja. Este fruto puede pesar entre 2.3 a 2.7 kg y lograr un tamaño de 10 x 20 cm (www.hort.purdue.edu). Este tipo de melones tienen una fina pubescencia que no es fácil de observar a simple vista, pero se puede sentir.

Cuando la pubescencia se cae, los melones están completamente maduros (Espinoza, 2002).

2.1.3. Características de cultivo.

C. melo L. requiere calor, así como de una atmósfera que no sea excesivamente húmeda (Espinoza, 2002). Es una planta muy exigente en temperatura, su cero vegetativo es de 12 °C, el intervalo de temperatura óptimo de germinación se encuentra entre 24 y 32 °C, de floración entre 20 y 23 °C y de crecimiento vegetativo entre 24 y 28 °C, siendo de fundamental importancia la temperatura del suelo a nivel radicular, para que haya una absorción normal de agua (Maroto, 1994; Zapata, *et al.*, 1989). En regiones húmedas y con poca insolación, los frutos presentan deficiente maduración. La calidad de ellos resulta mejor cuando más elevada sea la temperatura en el momento en que se aproxima la madurez (Espinoza, 2002).

La polinización es llevada a cabo por insectos, principalmente abejas (Raymond 1999). Cuando el fruto se encuentra en una etapa de maduración debe existir una relación de temperaturas en el día más altas y por la noche más frescas.

Cucumis melo L. es una planta poco exigente en cuanto a los requerimientos edáficos, sin embargo, proporciona mejores resultados cuando se cultiva en suelos con las siguientes características: rico nutrientes (en materia orgánica), profundo, mullido, aireado, drenado, bastante consistente formando terrones, ligeramente calcáreos y con un pH entre 6 y 7 (Espinoza, 2002; Raymond, 1999; Maroto, 1994; Zapata, *et al.*, 1989).

El cultivo de melón demanda, durante el periodo de crecimiento, un constante suministro de agua, por lo que una falta de ésta lleva consigo la reducción en los rendimientos (Espinoza, 2002).

2.1.4. Importancia económica

En la República Mexicana, las principales Cucurbitáceas son: la calabaza (*Cucúrbita* spp), el melón (*Cucumis melo* L.), el pepino (*Cucumis sativus* L.) y la sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb) Masnsf.). Una de las especies de mayor importancia es el melón, tanto por la superficie dedicada a su cultivo como por generador de divisas (alrededor de 90 mdd anuales) y empleos en el área rural. Desde los años veinte, este cultivo ha sido generador de divisas para México, sin embargo, es a partir de los años sesenta cuando su presencia toma mayor importancia entre los productores, debido a una mayor demanda tanto del mercado nacional como del internacional (Espinoza, 2002). Se calcula que entre los años 1992–2001 la mayor producción del país estuvo dada en Durango, seguida por Sonora y Michoacán datos que se pueden apreciar en la Figura 2.3.

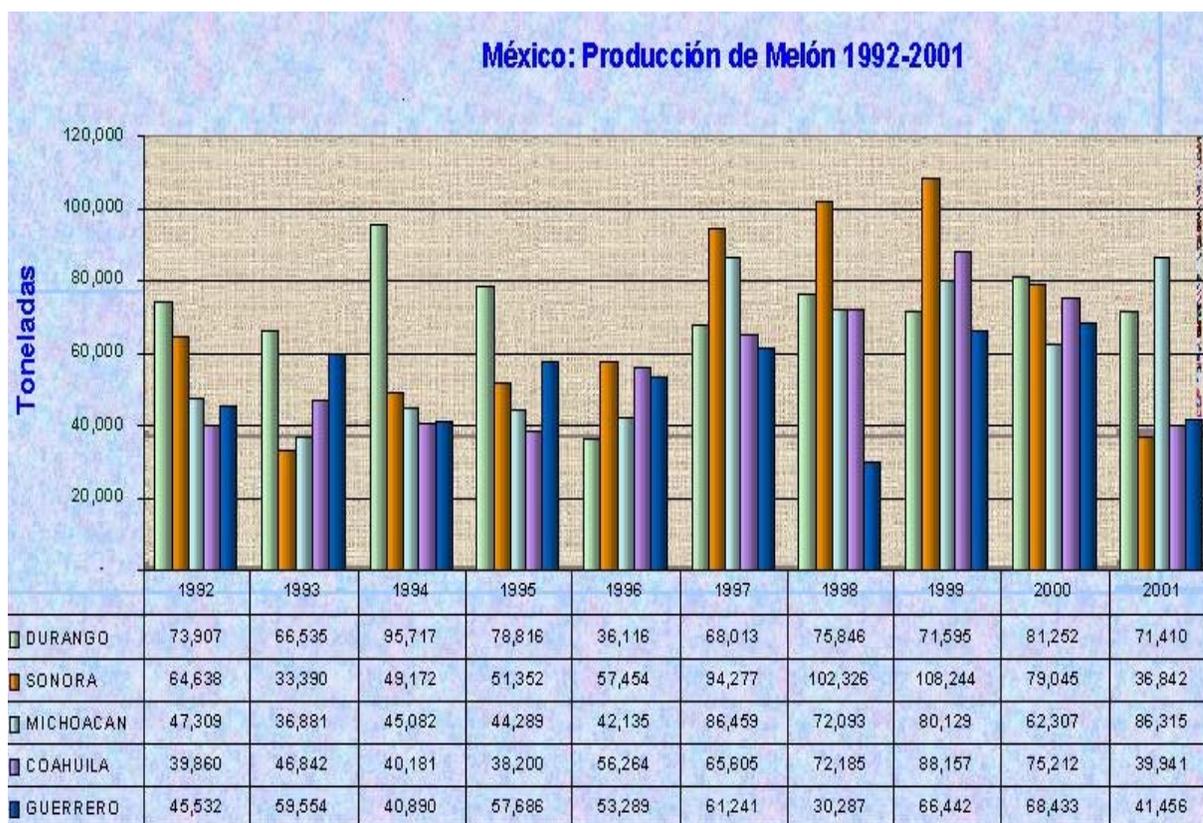


Figura 2.3. Producción del melón en México (www.sagarpa.gob.mex).

2.1.5. Valor nutricional.

El melón es poco nutritivo, pero tiene abundancia en materias azucaradas y mucilaginosas; posee propiedades refrescantes y facilita las secreciones. Dentro de su composición química el melón gota de miel contiene agua en grandes cantidades, carbohidratos, vitaminas como: ácido ascórbico, niacina, vitamina A, vitamina B6 y minerales como el hierro (Maroto, 1994; Espinoza, 2002; Raymon, 1999; Zapata *et al.*, 1989; www.infoagro.com).

2.2. El Cultivo de Tejidos Vegetales.

Definición.

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es un grupo de técnicas que pertenece a la biotecnología y ha contribuido de forma importante a nuestro conocimiento básico de la célula. La teoría celular de Schwann y Schleiden (1838-39), en la cual la célula se describe como la unidad biológica más pequeña a la que se puede considerar totipotente, ha sido respaldada por el cultivo de tejidos: una célula aislada es capaz de transformarse en una planta completa (Su, 2002; Barz y Oksman, 2002; Pierik, 1990; Lindsey y Jones, 1989; Margara, 1988).

Esta área biotecnológica se basa en la totipotencialidad celular, se define como el cultivo de plantas, semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos, sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles. Estas técnicas se caracterizan porque: ocurren a micro-escala, se optimizan las condiciones ambientales, en lo que se refiere a los factores físicos, nutricionales y hormonales y se excluyen todos los microorganismos y plagas (Pierik, 1990).

Para George y Sherington (1984) el término de cultivo de tejidos es usado comúnmente para describir todos los tipos del cultivo de plantas *in*

vitro, aunque estrictamente sólo lo refieren a los agregados celulares desorganizados. En la práctica los tipos de cultivos generalmente más reconocidos son: de callos, en suspensión, de protoplastos de anteras y de órganos.

El cultivo *in vitro* tiene también un papel importante como herramienta para alcanzar estudios que serían imposibles obtener *in vivo* (Pierik, 1990; Lindsey y Jones, 1989), y ha dado resultados de enorme importancia para la agricultura, horticultura y silvicultura (Pierik, 1990).

Ventajas y Desventajas del CTV.

Dentro de los grandes beneficios que presenta el cultivo de tejidos vegetales se pueden citar las siguientes características:

1. Requiere de poco espacio.
2. Asepsia, el trabajo se logra bajo condiciones libres de patógenos.
3. Condiciones controladas como son: luz, temperatura, nutrientes, reguladores de crecimiento.
4. Una producción continua, no se necesita pensar en las variaciones estacionales en las que el material con el que se trabaja está sujeta en condiciones *in vivo*.
5. Ahorro de trabajo, no se necesita atención entre subcultivos como: riego, eliminación de hierbas, fumigación.
6. Plantas stock, las cuales se pueden mantener por un largo periodo de tiempo.
7. Espectro de especies, se puede trabajar con más de una especie a la vez.
8. Se puede automatizar los procesos de trabajo, usando maquinaria.
9. Desarrollo en la investigación básica.
10. Biosíntesis y modificación de sustancias naturales en las células cultivadas.
11. Desarrollo en la industria químico-farmacéutica.

12. Desarrollo en el ámbito agrícola y hortícola.
13. Ayuda en la conservación de germoplasma.
14. Y sin duda alguna, el gran desarrollo del mejoramiento genético.

También existen desventajas en esta técnica:

1. Instalaciones y equipo muy especializado.
2. Mano de obra especializada.
3. Peligros de contaminación, por la que pueden existir pérdidas de material biológico y económico por la inversión de trabajo.
4. Desarrollo de protocolos especializados y que muchas veces resultan ser largos por el ensayo y error.
5. Variación somaclonal.
6. Costos, los costos de esta técnica son muy altos, se necesita mucha inversión (Lindsey y Jones, 1989; Chávez, 1993; Phillips and Hubstenberg, 1995).

2.3. Regeneración *in vitro*.

Dentro del CTV, existen dos vías por las que se puede alcanzar la regeneración de plantas, una de ellas es la embriogénesis somática, en la cual se lleva a cabo el desarrollo de embriones en sus tres etapas: globular, acorazonado y torpedo, a partir de células somáticas; los embriones somáticos son semejantes a los embriones cigóticos, los tejidos vasculares están unidos a los del tejido del explante, son estructuras bipolares con dos meristemo, uno de raíz y otro del brote.

La otra vía es la organogénesis, que se caracteriza por la formación y crecimiento de brotes y el subsecuente enraizamiento. El nuevo brote es un estructura unipolar y su tejido vascular está físicamente conectado al tejido de origen (Chávez, 1993).

Los reguladores de crecimiento juegan un papel crucial en la regeneración de plantas en cultivo *in vitro* por ejemplo, las auxinas están

implicadas en muchos procesos del desarrollo vegetal porque afectan a la división, crecimiento y diferenciación de las células (Acosta, *et al.*, 2000). Inducen la elongación celular debido a que aumentan la plasticidad de la pared y la penetración del agua a la célula, participan en la regulación del crecimiento diferencial y la regulación de los fenómenos de diferenciación, los cuales son estimulados o inhibidos según la concentración auxínica presente en la célula vegetal, afectan el alargamiento y la división celular, la formación de brotes, raíces, tallos y tejido calloso, la respiración, abscisión, partenocarpia, dominancia apical y embriogénesis (Acosta, *et al.*, 2000; Herman, 1995; Álvarez, 1994; George y Sherrington, 1984; www.omega.ilce.edu.mx y www.biologia.edu.ar).

Las citocininas promueven la división y expansión celular, el desarrollo de los cloroplastos, el alargamiento de las hojas y la floración, actúan en el retraso de la senescencia, la dominancia apical y tienen un papel fundamental en la organogénesis, ya que pueden inducir la morfogénesis, así como el crecimiento de yemas, tejidos *in vitro* de callo, hojas, cotiledones y tallo, además de inhibir el crecimiento de las raíces (Segura, 2000; Álvarez, 1994 y George y Sherrington, 1984).

Las citocininas actúan con otros estímulos, especialmente hormonales y ambientales como son las auxinas y la luz; aplicadas exógenamente son compuestos bastante inmóviles, que ejercen efectos muy localizados, normalmente solo actúan en el órgano en que fueron aplicadas como es el caso del nudo. Su actividad depende tanto de la naturaleza química del sustituyente en N⁶ de la adenina, como de la integridad del propio anillo de purina, la presencia del sustituyente es fundamental para que se promueva la división celular (Villaviscencio, 2002; Segura, 2000; Herman, 1995; Álvarez, 1994; y www.biologia.edu.ar).

2.3.1. Embriogénesis somática.

La embriogénesis somática (o asexual) es la producción de estructuras pseudoembrionarias a partir de células somáticas, las cuales se desarrollan para formar embriones completamente análogos a los embriones cigóticos. Un embrión somático es una estructura bipolar independiente y no está físicamente unida a su tejido de origen, contiene dos meristemas, el de brote y el de raíz. Los embriones somáticos pueden desarrollarse y germinar para formar plantas, de modo análogo a la germinación de los embriones cigóticos. La producción de embriones somáticos a partir de cultivos de células, tejidos u órganos puede tener lugar por dos vías, por la embriogénesis directa (sin una fase intermedia de formación de callo) y por la embriogénesis indirecta tras la formación de callo. Para la embriogénesis somática directa, el embrión cigótico inmaduro, es usado muchas veces como explante y la respuesta del embrión dependen en gran parte del estado de desarrollo en el que se encuentra el explante; ésta suele tener lugar a partir de un explante mantenido en un medio de cultivo sólido y puede utilizarse, para la micropropagación de una serie ilimitada de especies. La vía de la embriogénesis somática indirecta, por la cual los embriones somáticos son inducidos y desarrollados por la proliferación de callo y células en suspensión es generalmente más común. Las células embriogénicas parecen ser muy similares a las células meristemáticas en las que hay un pequeño y denso citoplasma, un gran núcleo y nucleolo prominente y contiene muchas vacuolas pequeñas, gotitas de lípidos y granos de almidón. Las células no embriogénicas usualmente tienen vacuolas grandes y granos variables. Los cultivos embriogénicos son altamente heterogéneos; pueden contener una mezcla de estructuras organogénicas y embriogénicas (Su, 2002; Lindsey y Jones, 1989; Lozoya, 1985 y George y Sherington, 1984).

Factores que influyen en la embriogénesis somática.

Medios de cultivo y reguladores de crecimiento.

La adquisición de competencia e inducción de la embriogénesis somática depende de las auxinas (usualmente 2,4-D) (Su, 2002). Con frecuencia se requiere de una elevada concentración de auxinas; sin embargo para el desarrollo del embrión, se debe bajar la concentración y en algunos casos retirar completamente este regulador del medio. La auxina 2,4-D juega un papel especialmente importante, ya que es el que induce la embriogénesis somática. Si bien, las citocininas no inducen por si solas la embriogénesis somática, sí son requeridas en bajas concentraciones para proliferar callos embriogénicos. Por otro lado, las sales inorgánicas tienen un efecto sobre la embriogénesis somática, en especial se ha demostrado que el nitrógeno reducido, en forma de iones amonio, puede ser un factor importante en la embriogénesis. El potasio la estimula, especialmente si existe la falta de nitrógeno (Pierik, 1990; Razdan, 2003).

Luz.

En estudios previos se ha observado que en cultivos *in vitro* de algunos cereales, cítricos y tabaco, la luz no es un factor determinante para la iniciación de embriones asexuales. Sin embargo con un fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad es posible la obtención de callos embriogénicos, a menos que el protocolo con el que se trabaje requiera cumplir con mayor cantidad de horas de oscuridad (Razdan, 2003).

Temperatura.

Las condiciones óptimas para los cultivos *in vitro* no son necesariamente las mismas que requiere la planta en su hábitat natural. La temperatura no es factor crítico para la embriogénesis, aunque ésta no debe exceder los límites de 20 a 30 °C para el cultivo de tejidos en general (Razdan, 2003).

Explantes a utilizar.

La longevidad de los tejidos influye en gran medida debido a que estos pierden su potencial con el tiempo, posiblemente a causa de cambios cariotípicos y de ploidía en respuestas a la presencia de auxinas, además de probables cambios epigenéticos (Pierik, 1990).

2.3.2. Organogénesis.

La organogénesis es una vía de desarrollo en la cual brotes o raíces han sido inducidos por diferenciación de una célula o un grupo de células. La regeneración de plantas *in vitro* por organogénesis generalmente implica la inducción y desarrollo de brotes provenientes del tejido de un explante, seguido por la transferencia hacia un medio diferente para inducir la formación y desarrollo de las raíces. Si el brote o raíz es inducido y desarrollado directamente del explante sin haber sufrido una fase de callo, es llamado organogénesis directa u organogénesis adventicia. La organogénesis indirecta implica una fase inicial de proliferación de tejido de callo que contiene células competentes de las cuales se originaran brotes en gran cantidad, los cuales tendrán que ser individualizados y transferidos a un nuevo medio para su desarrollo y establecimiento (Su, 2002; George y Sherington, 1984). En la organogénesis se pueden distinguir las siguientes etapas: desdiferenciación de células (que conducen probablemente a una redefinición y rejuvenecimiento de las células); división celular, generalmente seguida por formación de callo, cuando se dirige a la división celular, se puede comenzar la iniciación de órganos, su formación y por último el desarrollo de éstos (Pierik 1990; Schwarz y Beaty, 2000).

Factores que influyen en la organogénesis.

Medios de cultivo y reguladores de crecimiento.

Los callos son generalmente más capaces de regenerar raíces, que los vástagos adventicios. La inducción de raíces generalmente tiene lugar en

medios con concentraciones de auxinas, relativamente altas, pero concentraciones de citocininas bajas. La iniciación de primordios radicales generalmente requiere una concentración de auxinas más alta que la que se necesita para el posterior crecimiento de los mismos primordios. Las raíces y los vástagos se forman por lo general de forma completamente independiente unos con respecto a los otros, no existe conexión entre ellos, aunque se originen a partir de un callo, al mismo tiempo (Su, 2002; Pierik, 1990).

La formación de vástagos puede producirse, si existe una baja concentración de auxinas y una alta concentración de citocininas. En algunas ocasiones se producen raíces adventicias en la base de los vástagos adventicios. La elevación en la concentración de amonio puede estimular la organogénesis; Pierik y Steegmans (1976) demostraron que en el caso de *Anthurium andreanum* una disminución de la concentración de amonio estimuló la formación de vástagos adventicios sobre el callo (Pierik, 1990; Razdan, 2003).

Luz.

El requerimiento de luz para la inducción de brotes es elevado (Pierik, 1990), la cual estimula el desarrollo en la mayoría de los casos, aunque existen especies que en condiciones de obscuridad se favorece la formación de vástagos. En la inducción de raíces la presencia de luz puede disminuir su aparición ya que las condiciones de obscuridad podrían semejarse a las condiciones de suelo en las que se desarrolla la planta en forma natural (Herman, 1995; Razdan, 2003).

Temperatura.

Al igual que la luz, las temperaturas elevadas estimulan la formación de brotes (Pierik, 1990), la misma que requiera la planta en su hábitat natural, aproximadamente 30 ± 2 °C (Herman, 1995).

Explantes a utilizar.

En la mayor parte de los casos, la formación de órganos vía organogénesis se induce mucho más fácilmente en plantas juveniles que en plantas adultas (Su, 2002; Pierik, 1990; Lindsey y Jones, 1989; George y Sherington, 1984). Las plantas en estado vegetativo responden mejor que las plantas en floración; se ha demostrado, que en algunas especies, las plantas femeninas tienen una mayor capacidad regenerativa que las plantas masculinas.

En las plantas cualquier segmento tiene capacidad regenerativa; factores que puede influir en son los involucrados directamente en el explante como: la edad de la planta donadora, la zona donde se obtenga, el tamaño y el tipo de órgano (Schwarz y Beaty, 2000).

2.4. Regeneración *in vitro* de *C. melo* L.

Las plantas de melón han sido regeneradas mediante el cultivo de tejidos por varias técnicas que incluyen la organogénesis, embriogénesis y regeneración de protoplastos; para lograr estos sistemas de regeneración se necesitó probar diferentes tipos y concentraciones de auxinas y citocininas las cuales son factores críticos, sin olvidar los explantes. La respuesta morfogénica de los explantes durante el cultivo de tejido depende del genotipo y de las características fisiológicas en el tejido usado. La regeneración vía organogénesis ha sido la más eficiente y probada en explantes provenientes de cotiledones, hipocótilos, hojas, pecíolos y raíces (Kathal, *et al.*, 1988; Niedz, *et al.*, 1989; Dirks y Buggenum, 1989; Tabei, *et al.*, 1991; Kathal, *et al.*, 1994; Singh, *et al.*, 1996; Liborio, *et al.*, 2001; Papadopoulou y Grumet, 2002).

La morfogénesis *in vitro* de *C. melo* L. ha sido obtenida por medio de segmentos de cotiledón en el medio de MS (Murashigue y Skoog, 1962) conteniendo BAP en diferentes concentraciones (0.5 y 1.0 μM), el 100% de los explantes mostró una regeneración directa de brotes en medio con 0.5

μM de BAP además de presentar aproximadamente 16 brotes por explante, cuando los explantes se cambiaron de posición bajo las mismas condiciones de cultivo, dieron la formación de callo, aunque la producción de brotes se redujo (Singh, *et al.*, 1996).

Existen muchos factores que influyen en la regeneración de *C. melo* L., un ejemplo de ello es el trabajo hecho por Niedz, *et al.*, en 1989, el cual toma en cuenta elementos importantes para la obtención de brotes como son: el explante (cotiledón, hipocótilo, pecíolo y hojas primarias), edad del explante (cotiledones de 4, 7 y 18 días), condiciones de luz (0, 5, 10, 30, 60 y $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de lámparas fluorescentes), temperatura (21, 25 y 29°C), tipo de cultivar (probando 4 cultivares: Superstar, Hearts of Gold, Hale's Best Jumbo y Goldstar) y componentes del medio el cual se basó en MS y diferentes reguladores de crecimiento (medio 1; medio MS + $5 \mu\text{M}$ de BAP más una de las siguientes citocininas: cinetina, zeatina, BAP, 2iP; medio 2: medio MS + BAP y AIA en concentraciones de 0, 5 y $10 \mu\text{M}$ y medio 3: medio MS + BAP y AIA en una concentración de $5 \mu\text{M}$ + 10mg l^{-1} de nitrato de plata más uno de los tres reguladores de crecimiento: ABA, AG_3 y Tidiazuron). En el experimento se observó que la variedad Hale's Best Jumbo mostró el porcentaje más alto en la formación de yemas por lo que se tomó en cuenta para los siguientes experimentos; con respecto al medio 1, la mezcla con BAP resultó ser el que mayor proliferación de brotes originó y el medio 2 tuvo éxito en la producción de brotes, iniciación de yemas y la formación directa de brotes. En cuanto a la edad de los explantes, el más joven fue el más exitoso en la formación de yemas, aunque las tres edades dieron respuestas similares en cuanto a la proliferación de callo. Con lo que respecta al tipo de explante no hubo diferencias significativas, aunque al parecer la formación de yemas y brotes estuvo presente en el pecíolo y en las hojas primarias. La intensidad lumínica en donde tuvo un mejor desarrollo la formación de yemas ocurrió entre $5\text{--}30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y en cuanto a la temperatura a 21°C . En el

caso del medio 3, la adición de ABA al medio de cultivo logró ser muy exitosa.

Algo parecido ocurrió con los experimentos de Tabei y colaboradores (1991), donde se experimentó con segmentos de cotiledones, hipocótilos y hojas con pecíolo de plantas jóvenes que se cultivaron en medios suplementados con auxinas (2,4-D, ANA y AIA), la proliferación de callo se observó más vigorosa en medio con 0.45 μM de 2,4-D, aunque también existió una formación directa de brotes. Los cotiledones de semillas y los explantes de hoja comparados con los otros explantes trabajados presentan la más alta eficiencia de producción de brotes en medio con 0.01 μM de 2,4-D; en la mayoría de los explantes hubo formación de embriones somáticos en medios con 4.52 ó 9.0 μM , presentando los cotiledones el más alto porcentaje de formación de embriones en medios con 9.0 μM de 2,4-D (Tabei, *et al.*, 1991).

El cultivo de segmentos de cotiledones y hojas (Dirks y Buggenum, 1989) cultivados en 4.44 μM de BAP facilitó la inducción de brotes, aunque hubo más experimentos mezclando diferentes concentraciones de BAP, zeatina y AIA no se mostraron resultados significativos.

Existen pocos trabajos donde el explante utilizado para la regeneración de plantas de melón no es el cotiledón o el hipocótilo, ejemplos son los trabajos de Kathal, *et al.*, 1988 donde los explantes fueron hojas y pecíolos de distintas edades, en medios adicionados con auxinas + auxinas y citocininas + auxinas; y Kathal, *et al.*, 1994 que tuvo desarrollo con diferentes segmentos de diferentes lugares a lo largo de la raíz principal, cultivados en medios de inducción con mezclas de auxinas y citocininas.

En el trabajo de Kathal, *et al.*, (1988) de la máxima inducción de brotes fue en el 91% de los cultivos en medios con 5 μM de BAP, la sustitución de esta concentración de BAP por 2iP en 10 μM resultó ser mejor para la elongación de brotes que redujo el porcentaje de los cultivos; la combinación de las dos citocininas ambas en una concentración de 1 μM promovió la

diferenciación de yemas. Mientras sea menor la edad de la planta donadora y menor el tamaño de la hoja, el porcentaje de cultivos que muestra la regeneración es mayor.

En el caso de los experimentos de Kathal y colaboradores (1994), trabajaron con el cultivar *Pusa sharbati* donde tomaron en cuenta el efecto de la edad de la plántula donadora, posición del explante a lo largo de la raíz principal y reguladores de crecimiento. La citocinina BAP en una concentración de 3 μ M indujo una alta proliferación de nódulos, pero tuvo una mayor formación de éstos en combinación con 2iP (3 μ M), también formando callo, desde colores crema con apariencia friables hasta llegar a una tonalidad verde muy fuerte y vistosa con una consistencia muy compacta, para posteriormente diferenciarse a yemas. En cuanto a la posición de donde se obtuvo el explante, la frecuencia de formación de nódulos decreció cuando se incrementa la distancia del hipocótilo.

Por otro lado, el trabajo de Liborio y colaboradores (2001), destaca la investigación bibliográfica hecha previamente y contempla todo tipo de trabajos realizados con anterioridad, con la intención de montar un protocolo de regeneración de *C. melo* L. mucho más exitoso y más complejo. El trabajo tuvo como objetivo definir el proceso morfogénico eficiente en tres cultivares de la variedad *inodorus* melón amarillo, el cual ha sido muy poco trabajado, además de realizar estudios histológicos para hacer una caracterización morfológica (Liborio *et al.*, 2001).

En la literatura existen trabajos donde el objetivo, es probar diferentes reguladores de crecimiento a los ya experimentados previamente, los cuales tienen un efecto similar, hacer protocolos mucho más eficientes y optimizados, un ejemplo es el trabajo de Shetty, *et al.*, 1992, el cual se basó en el protocolo de regeneración de plantas de melón establecido por Dirks y Buggennum (1989), donde toman como referencia la técnica de obtención de explantes cotiledonarios y el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962)

más 1 mg l⁻¹ (4.4 µM) de BAP; donde se probaron varias concentraciones de prolina, ácido salicílico, aspirina y thioprolina.

También se cuenta con los trabajos que están basados en un protocolo previo, hecho por el mismo autor, como son los trabajos de Leshem y colaboradores, en los cuales tratan de probar como los factores externos al cultivo pueden alterar la regeneración de brotes. En uno de los dos trabajos Su, 1994, el equipo se basó en protocolos previos, en donde prueban el tidiazuron y paclobutrazol con efectos similares de citocinina y auxina para conocer la influencia que tienen en la regeneración de órganos y el perfil proteínico (Leshem, *et al.*, 1994). El otro, basado en el trabajo de Leshem, 1989 que consistió en la regeneración de melón por medio del cultivo de cotiledones en citocininas en un libre arreglo de determinado porcentaje de concentraciones del metabolismo polipéptico.

Por último Leshem, *et al.*, 1995 demuestran como la citocinina BAP junto con la luz blanca realzan el metabolismo polipéptico y la regeneración de brotes basado en el trabajo de Leshem *et al.*, (1994).

Cucumis melo L. es un eficiente sistema de regeneración, puede ser utilizado en variación somaclonal y en estudios de transformación genética (Niedz, *et al.*, 1989). Experimentos que destacan trabajos previos de regeneración de melón son los de Ezura y colaboradores (1997) realizados fundamentalmente en estudios de variación somaclonal y transformación genética. Uno de ellos basado en el protocolo de la inducción de agregados de primordios de brotes, donde estudian la estabilidad en la ploidía a largo plazo en el cultivo de primordios y en la producción de plantas de melón.

La técnica de cultivo de tejidos permite obtener a través de variabilidad genética la selección de variantes somaclonales, la hibridación somática, así como la introducción de nuevos caracteres en el cultivo de plantas por medio de la manipulación genética, estos eventos requieren de la regeneración de plantas completas (Kathal, *et al.*, 1994)

2.5. Modelos biológicos.

El cultivo *in vitro* de células vegetales y su rediferenciación para formar plantas completas, ha abierto un sinnúmero de posibilidades experimentales a la investigación genética en las plantas (Robert, 1986); se ha convertido en una herramienta, que se puede aplicar en botánica (taxonomía, morfología y fisiología), genética (citología, ecología y genética molecular), matemáticas (biometría, estadística), química (comida, fibras y combustibles químicos) y finalmente en la economía (agricultura, bosque e industria), (Tigerstedt y Niskanen, 2002; Barz y Oksman, 2002), resultando una técnica biotecnológica óptima para generar y caracterizar modelos biológicos en demanda de nuevos métodos que permitan cruzar las barreras biológicas impuestas por la fisiología de las especies (Sánchez, 1986).

Un modelo biológico, tiene como objetivo dar una descripción formal de la respuesta de una planta a las condiciones de su entorno, permite hacer predicciones y puede usarse para aproximar la respuesta de plantas semejantes. Para que una planta pueda ser tomada en cuenta como un modelo biológico, debe cumplir o poseer con ciertos requisitos como son: ciclo de vida corto, crecimiento rápido y controlado, un genoma pequeño, plasticidad en las respuestas morfogénicas, células totipotenciales, capacidad para proporcionar abundante biomasa e importancia económica (Hernández, 2003).

La utilidad que se le conoce a los modelos biológicos, es la de brindar conocimientos tanto en aspectos químicos y fisiológicos como las de estudiar las condiciones de inducción y producción de metabolitos (optimización de medios de cultivo y condiciones ambientales y como modelos de predicción); producción de fitofármacos (modelos para valorar la actividad de plantas medicinales) y transgénicos; regeneración de plantas como son las medicinales, las que están en peligro de extinción y de interés agrícola, además del económico (extracción de plantas silvestres, sobreexplotación, baja producción, uso sostenible). Un ejemplo por excelencia es *Arabidopsis*

thaliana como modelo genético, tiene un ciclo de vida de apenas tres semanas, es el primer genoma vegetal el cual fue se tiene completo el mapeo de todos sus cromosomas, de tamaño pequeño, de alrededor de 25,000 genes, apenas un 30% inferior al número de genes humanos, además su mapa va a aportar elementos claves para entender la distribución y función de los genes en plantas (Sánchez, 1986).

Algunas otras plantas que han servido como modelo biológico y que hoy en día son de gran utilidad en el CTV son: la zanahoria (*Daucus carota* L.) como modelo para el desarrollo de embriogénesis somática; el tabaco (*Nicotiana tabacum*) para el desarrollo de plantas libres de virus; la papa (*Solanum tuberosum*) modelo de pruebas de resistencia a *Phytophthora*; el jitomate (*Lycopersicum esculentum* L.); el maíz (*Zea mays*) como modelos de transformación en monocotiledóneas y resistencia contra herbicidas e insectos y por último (*Catharanthus roseus*) como modelos para obtener alcaloides (serpentina y ajmalicina), anticancerígenos y antileucémicos (Hernández, 2003).

Efectivamente, algunos de los problemas más importantes en el avance de la bioquímica y la genética molecular, pueden ser resueltos satisfactoriamente por medio de las técnicas de cultivo *in vitro*. La selección directa de mutantes, una ventaja experimental antes restringida a los microorganismos, puede ahora lograrse con células vegetales en cultivo. Estos sistemas proporcionan un modelo para el estudio del metabolismo intermedio, de las rutas metabólicas alternas, de los mecanismos de regulación epigenética y de regulación genética, de los caracteres hereditarios, etc. (Sánchez-Serrano, 2000 y Barz y Oksman, 2002).

Las plantas no podrían competir como sistema experimental para estudios en bioquímica y genética molecular, sin las grandes ventajas que ellas presentan como son: homogeneidad y disponibilidad del material, tiempo de generación corto, reproducibilidad del sistema, abundancia de poblaciones y ahorro en tiempo y espacio (Sánchez, 1986).

2.5.1. El melón como modelo biológico para la transformación genética.

Desde los 90's el melón ha sido blanco en investigación de transformación. Después de iniciado el desarrollo de los sistemas de modificación genética usando marcadores, *C. melo* ha sido transformado por *Agrobacterium tumefaciens* (Fang y Grumet, 1990; Vallés y Lasa, 1994; Shetty, *et al.*, 1997; Akasaka-Kennedy, *et al.*, 2004) y por bombardeo de partículas (Gonsalves, *et al.*, 1994; Papadopoulou y Grumet, 2002), con una variedad de usos potencialmente económicos como son: resistencia a virus, características de madurez, tolerancia a la salinidad y alteraciones en la composición de proteínas. La industria semillera ha sido muy activa en esta área, en 1997-1999, se dieron a conocer más de 50 aplicaciones (Papadopoulou y Grumet, 2002).

El producir plantas transgénica de *C. melo* L. tiene como objetivo el introducir caracteres genéticos que incrementen el número de planta por siembra, mayor cantidad de frutos y con mayor peso, cosecha temprana, mejoran la calidad de la fruta (componentes primarios de sucrosa) e incrementan la vida de poscosecha. Resistencia al estrés ambiental, principalmente sequía y salinidad, reducir las pérdidas de producción resultado de la susceptibilidad a varios insectos y enfermedades, lo cual es de alta prioridad en el mundo (Papadopoulou y Grumet, 2002); ser resistentes a importantes enfermedades por hongos tales como *Sphaerotheca fuliginea* y *Pseudoperonospora cubensis*, *Fusarium oxysporus* f. sp. *melonis* y *F. solani*. Muchos sembradíos se han perdido por infectarse de virus como los transmitidos por la paloma blanca, virus de hoja y virus transmitidos por áfidos, incluyendo el del mosaico de calabaza, el amarillo zucchini, el mosaico de sandía y de papaya; he ahí la intención de hacerlos resistentes a tales enfermedades (Vallés y Lasa, 1994, Papadopoulou y Grumet, 2002). La transformación ha sido llevada a cabo exitosamente en lugares como Estados Unidos, Europa, Medio Oriente y Asia (Papadopoulou y Grumet, 2002).

En la mayoría de las investigaciones donde se emplea la transformación de *C. melo* L., se ha empleado la técnica de la organogénesis (Fang y Grumet, 1990; Vallés y Lasa; 1994 y Shetty, *et al.*, 1997) y la embriogénesis somática (Akazaka-Kennedy, *et al.*, 2004), este último con el objetivo de transformación de embriones; la investigación se destaca por hacer una revisión de diversos autores, toma en cuenta dos cultivares (Vendrantis y Earl's Favourite Fuyu A), explantes de cotiledón de diversos tamaños y heridas, medios de cultivo líquidos y sólidos, variando los reguladores de crecimiento y las concentraciones, hasta obtener la transformación genética con *Agrobacterium tumefaciens*.

3. OBJETIVOS

Objetivo General.

Obtener la regeneración de plántulas de melón (*Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naudi tipo honey dew) a partir de cultivos *in vitro* por cualquiera de las dos vías, organogénica o embriogénica, realizar el análisis histológico para determinar el origen de las plantas regeneradas.

Objetivos Particulares.

- Determinar el tratamiento más exitoso para la desinfección de semillas botánicas.
- Seleccionar el mejor explante en cuanto a la formación de callo y regeneración de brotes.
- Determinar el medio de cultivo y los reguladores de crecimiento óptimos para inducir la formación de callo y la regeneración.
- Caracterizar el cultivo *in vitro* de melón como modelo biológico.
- Realizar el análisis histológico de las respuestas morfológicas presentadas en el material biológico trabajado *in vitro*: explante de nudo, agregados de callo y el comienzo de la formación de brotes.

4. HIPÓTESIS

Si la planta de melón presenta varios nudos a lo largo de su tallo (con zonas meristemáticas), entonces la inducción de callo y regeneración de plántulas se verá favorecida por la presencia de dichas zonas y modulada por la presencia exógena de auxinas-citocininas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Ruta crítica.

El presente trabajo se llevó a cabo en dos partes: la primera consistió en el establecimiento de cultivos *in vitro* para la regeneración de *Cucumis melo* L. var. *inodorus* tipo honey dew, (Figura 5.1) se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Química y la segunda parte que consistió en el análisis histológico de explante de nudo, callo y brotes de desarrollo (Figura 5.2) llevado a cabo en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias.

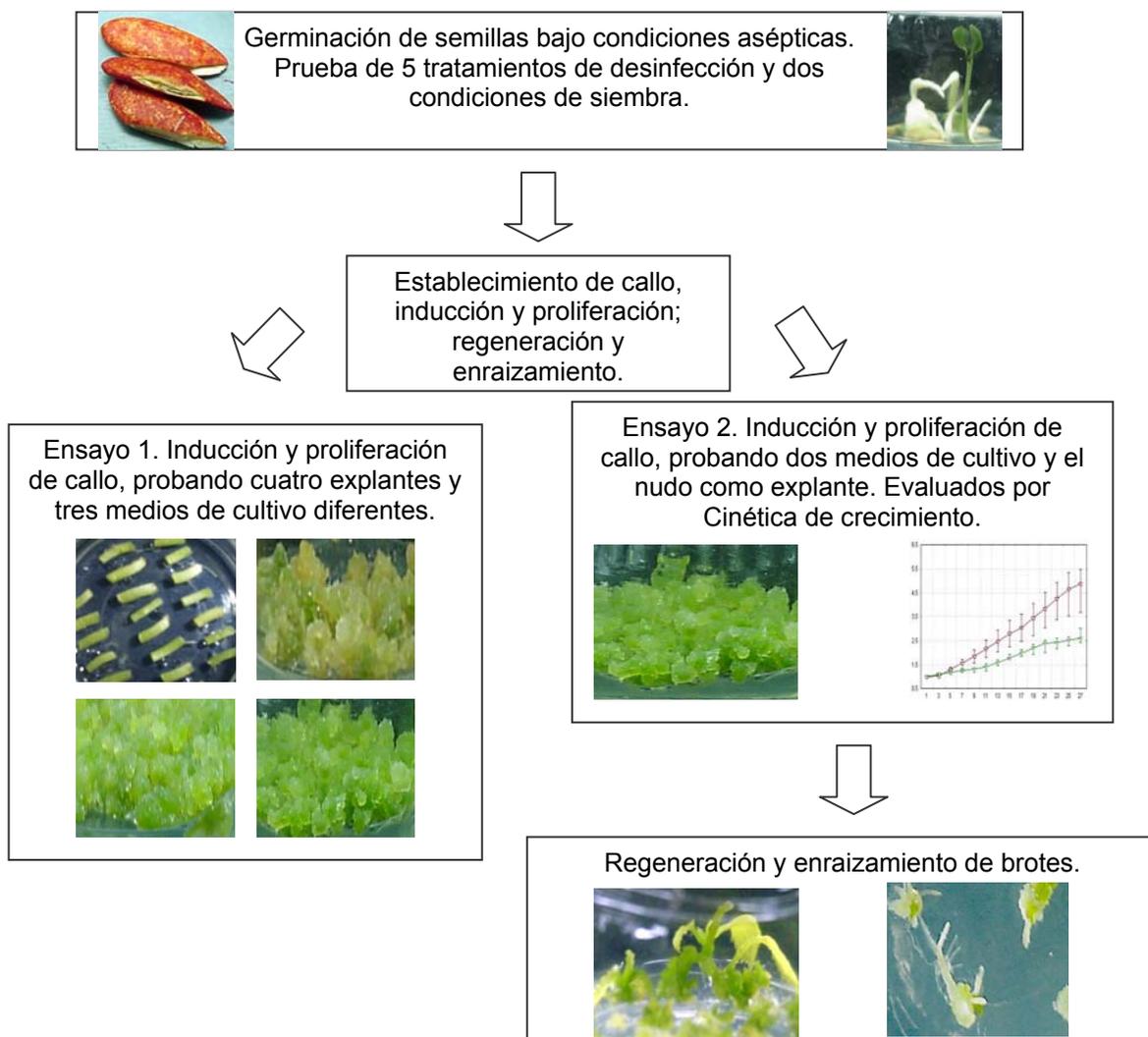


Figura 5.1. Ruta crítica del trabajo de cultivo *in vitro*.

Elección de muestras, provenientes del cultivo *in vitro*. Explantes de nudo, agregados de callo y el inicio de la formación de brotes.



Procesamiento de las muestras: a) tinción con azul de toluidina, b) deshidratación con alcoholes graduales y c) inclusión en Paraplast y LR-White.



Obtención de cortes y laminillas: a) microtomía, b) selección de cortes y c) tinción.



Observaciones en microscopio óptico e interpretación de laminillas.

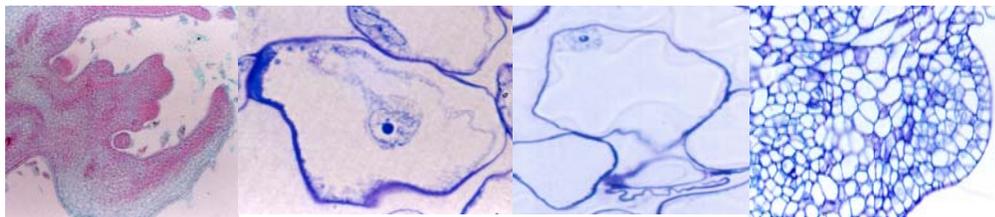


Figura 5.2. Ruta crítica del análisis histológico.

5.2. Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Cucumis melo* L. var. *inodorus* tipo honey dew y su regeneración.

5.2.1. Material biológico.

Para el inicio de los cultivos asépticos se utilizó semilla botánica de *Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naudi tipo honey dew (gota de miel), la cual fue proporcionada por el Dr. Miguel Gómez-Lim del Centro de Investigaciones de Estudios Avanzados (CINVESTAV) - Irapuato.

5.2.2. Aspectos Generales.

Preparación de medios de cultivo.

La preparación de medios de cultivo se realizó a través de soluciones madre concentradas 100X, utilizándose sales de medios de cultivo diferentes MS, Myt y SH. Los medios se adicionaron con sacarosa comercial, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento y como ingrediente gelificante Gellrite® en diferentes combinaciones y concentraciones como se especificará en cada etapa.

Cabe señalar que en algunas etapas, los medios fueron también suplementados con antibiótico. El pH de los medios fue ajustado a 5.7 - 5.8 utilizándose NaOH 1 N y 0.1 N ó HCl 1 N y 0.1 N según fuera necesario. El medio se dosificó a razón de 30 ml por frasco de alimento infantil y posteriormente se esterilizó en una autoclave vertical a 122 °C, 1.2 kg/cm² durante 18 minutos.

Incubación y subcultivo.

Todos los cultivos se mantuvieron en cuartos de incubación a 25 ± 2°C y un fotoperiodo de 16 horas luz a una intensidad de 50-60 μmol m⁻² s⁻¹ por 8 horas de obscuridad, excepto en la germinación que se mantuvo en obscuridad con una duración de cinco a ocho días a la misma temperatura. Los subcultivos se realizaron cada tres semanas (21 días) a excepción del

medio SH, que después del primer subcultivo a las tres semanas, se subcultivó cada dos semanas (14 días).

5.2.3. Germinación de semillas bajo condiciones asépticas.

Se probaron cinco tratamientos de desinfección modificando la concentración y tiempo de las sustancias desinfectantes; la siembra tuvo variaciones en el método de escarificación y en el medio con antibiótico, cabe mencionar que los tratamientos fueron probados uno a uno, consecutivamente, al observar la deficiencia que tenía cada uno de ellos, se probó un siguiente, adicionando nuevas sustancias desinfectantes y/o variando el tiempo de exposición, como se muestra en la Tabla 5-1.

Tabla 5.1. Tratamientos probados en el proceso de desinfección y siembra de semillas.

T R A T A M I E N T O S					
Sustancias, concentración y tiempos	1	2	3	4	5
Escarificación manual	x	x	x	√	√
dH ₂ O estéril	√	√	√	√	√
Etanol	50% (v/v) por 1min	40% (v/v) por 2 min	40% (v/v) por 2 min	40% (v/v) por 2 min	50% (v/v) por 4 min
NaClO ₂ ^a +microdyn ^{®b} + tween 20 ^c	5% (v/v) por 10 min	10% (v/v) por 20 min	8% (v/v) por 20 min	8% (v/v) por 20 min	8% (v/v) por 25 min
Bactericida ^d	x	2g l ⁻¹ por 15 min	2g l ⁻¹ por 15 min	2g l ⁻¹ por 20 min	2g l ⁻¹ por 25 min
Fungicida ^e	x	x	x	x	1g l ⁻¹ por 20 min
dH ₂ O estéril + antibiótico	x	x	x	amikacina ^f 50 mg l ⁻¹	amikacina 50 mg l ⁻¹
Siembra en medio con antibiótico	x	amikacina 50 mg l ⁻¹	amikacina 50 mg l ⁻¹	amikacina 50 mg l ⁻¹	claforan ^g 0.5 mg l ⁻¹

- a. Blanqueador comercial con 6% de ingrediente activo como agente desinfectante
- b. Nitrato de plata como agente desinfectante
- c. Agente tensoactivo, surfactante
- d. Agri-mycin 500 (sulfato de estreptomycin, clorhidrato de oxitetraciclina y sulfato tribásico de cobre)
- e. Benlate. Benomyl
- f. Amikacina
- g. Cefotaxime

Todas las semillas se sembraron en medio MS con la mitad de las sales (MS-I) suplementado con 3% sacarosa, 2.5 g l⁻¹ de Gellrite®, vitamina R₂ y glicina (ver anexo).

Se sembraron seis semillas por frasco y se incubaron bajo condiciones de oscuridad a 25 ± 2 °C de cinco a ocho días, posteriormente se colocaron en luz para permitir su desarrollo como se muestra en la Figura 5.3.

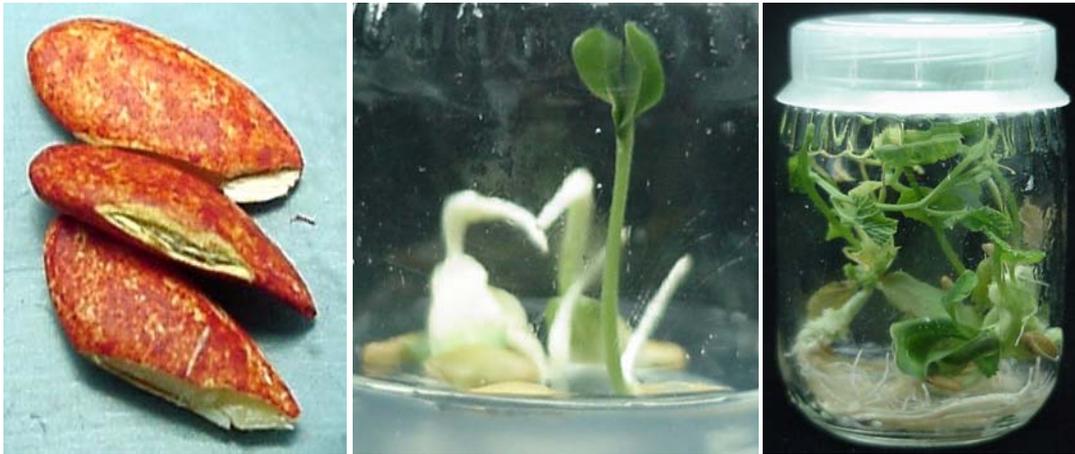


Figura 5.3. *C. melo* L. a) semillas escarificadas, b) germinación de 10 días de siembra y c) plántulas en desarrollo de 5 semanas de edad

La efectividad de la desinfección y germinación se evaluó en porcentajes, tomando en cuenta la presencia o ausencia de contaminación, la aparición de radículas y cotiledones y la oxidación de los tejidos presentes en las semillas.

5.2.4. Establecimiento de callos inducción y proliferación, regeneración y enraizamiento de brotes.

El objetivo de esta etapa fue seleccionar el medio y el explante óptimo para la proliferación de callo, así como obtener la regeneración de brotes y el desarrollo de las plántulas.

Ensayo 1. Inducción y proliferación de callos. Aquí se probó la eficiencia de inducción y proliferación de callos y la producción de brotes de tres medios de cultivo MS-II, Myt y SH. En el caso de MS-II y Myt, los macro y micronutrientes fueron los del medio MS, adicionados con Cóctel 20, antioxidante, sacarosa y gelificante. Con respecto a los reguladores de crecimiento, MS-II contuvo AIA y Cin y Myt BAP y 2,4-D. Para SH la sales fueron las del medio ya conocido como SH, este se suplemento con vitamina Nitch, antioxidante, sacarosa, gelificante; como reguladores de crecimiento 2,4-D en altas concentraciones y BAP, mostrados en la Tabla 5.2.

La elección de los medios dependió de los ya probados con anterioridad en investigación realizada en el laboratorio de CTV y en reguladores de crecimiento probados en trabajos que se llevaron a cabo con *Cucumis melo* L. en otros equipos de trabajo.

Tabla 5.2. Especificación de medios para inducción de callo.

Medio Sustancias	MS-II	Myt	SH
Sales	10 ml l ⁻¹	10 ml l ⁻¹	10 ml l ⁻¹
Cóctel 20	10 ml l ⁻¹	10 ml l ⁻¹	x
Vitamina Nitch	x	x	10 ml l ⁻¹
Adenina	x	10 ml l ⁻¹	x
Antioxidante	2 ml l ⁻¹	1 ml l ⁻¹	7 ml l ⁻¹
Cinetina	6 mg l ⁻¹	x	x
BAP	x	0.3 mg l ⁻¹	0.2 mg l ⁻¹
AIA	1.5 mg l ⁻¹	x	x
2,4 – D	x	3 mg l ⁻¹	6 mg l ⁻¹
Sacarosa	30 g l ⁻¹	30 g l ⁻¹	20 g l ⁻¹
Gellrite®	2.5 g l ⁻¹	2.5 g l ⁻¹	2.5 g l ⁻¹

- Las cantidades adicionadas a cada medio se hacen en base a soluciones stock 100X

Además de los tres medio nutritivos, se probaron cuatro explantes, considerando diferentes tipos celulares: hoja verdadera, pecíolo, entrenudo y nudo. Para obtener el explante, se tomo en cuenta que las áreas de corte estuvieran sanas (color verde, sin estar trozadas), sin importar si eran áreas cercanas a las raíces o alejados de éstas. Los explantes de hoja se cortaron en cuadros de 0.5 x 0.5 cm, sembrados con el envés hacia el medio de cultivo, los pecíolos fueron cilindros de 0.5 cm de largo, los entrenudos (tallo) se cortaron en cilindros de 1 cm aproximadamente, y en el caso de los nudos su tamaño dependió del lugar donde se cortaron, hubo nudos de 0.4 cm de largo hasta de 0.7 cm. Los lugares donde se obtuvieron los explantes son mostrados en la Figura 5.4.

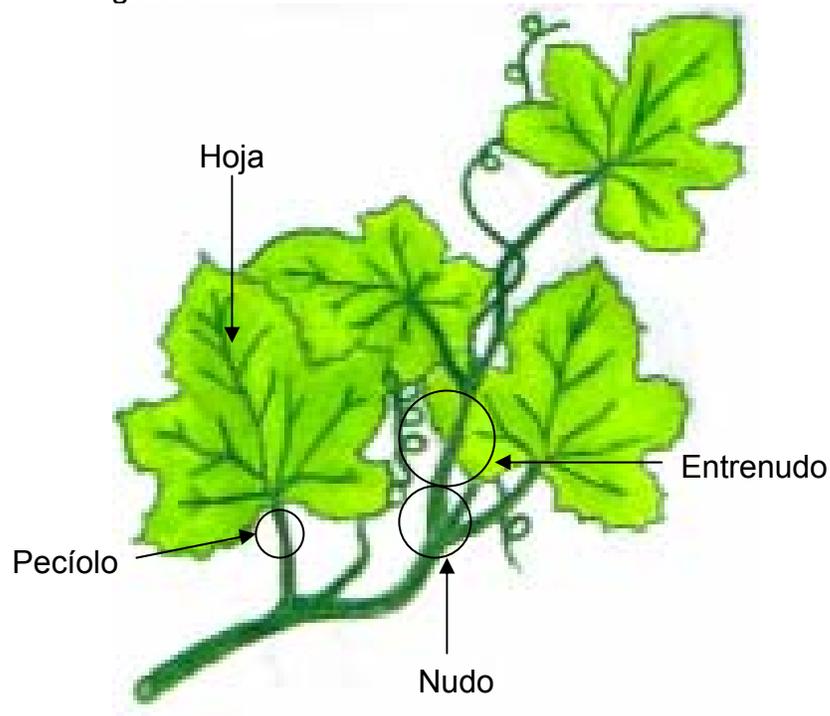


Figura 5.4. Explantes utilizados.

En total se tuvo las combinaciones de, tres medios de cultivo y cuatro explantes, las que son presentadas en la Tabla 5.3, al igual que se presentan la cantidad de frascos con las que se llevó acabo en el ensayo 1.

Tabla 5.3. Total de explantes y combinaciones en tres medios de cultivo y cuatro explantes, trabajadas en el ensayo 1.

Medio \ Explante	Hoja total	Pecíolo total	Entrenudo total	Nudo total
MS-II	64	48.	80.	66
Myt	68.	60.	80.	66
SH	68.	50	80	66

Las condiciones de luz bajo las cuales se incubó el *ensayo 1* fueron las ya antes mencionadas. El material biológico trabajado con el medio MS-II se cultivó por ocho meses, el de Myt por seis meses y por dos meses y medio el de SH.

Para poder identificar el medio y el explante que presentó mayor proliferación de callo, se hicieron observaciones periódicas, donde se evaluó la formación de callo, apariencia y cambios de estructuras, todos estos se registraron en porcentajes, donde el 100% fue el frasco con los explantes en él sembrados, conforme los explantes cambiaron a callo, se fue evaluando ese porcentaje. También se hicieron observaciones, solo para registrar la formación de brotes

Ensayo 2. Inducción, proliferación y cinética de crecimiento de callos. De las pruebas realizadas en el *ensayo 1* se pudo elegir la combinación medio de cultivo - explante más exitoso en cuanto a la proliferación de callo y formación de brotes, de tal forma se eligieron a MS-II y Myt como medios nutritivos y al nudo como explante.

Para el desarrollo de la cinética de crecimiento primero se llevó acabo la inducción de callo en los medios ya mencionados con el explante de nudo, se trabajó con 21 replicas de MS-II y 16 de Myt con un total de 134 nudos, 84 para MS-II y 50 para Myt.

La cinética de crecimiento se realizó con callo de 10 semanas de cultivo, (contando a partir del día en que se inoculó) con la intención de conocer las fases de crecimiento que presenta el callo en los dos medios de cultivo. Los datos para las curvas se obtuvieron en peso en fresco de callo, con balanza granataria. Dichos registros se realizaron cada tercer día durante tres semanas (27 días), comenzando con 1 g de callo (día 1), con un total de 10 replicas para cada medio de cultivo.

Regeneración y enraizamiento. El callo que se trabajó con anterioridad, en este mismo ensayo, se subcultivó por un total de 15 semanas en su medio de inducción, MS-II o Myt, al siguiente subcultivo semana 18, se colocó en medio MS sin reguladores de crecimiento para inducir la formación de brotes, permitir su desarrollo y a su vez estos brotes llevarlos al enraizamiento en medio MS más AIA 2 mg l⁻¹ (medio MS-III)

Los resultados obtenidos en el ensayo 2 se analizaron estadísticamente utilizando el programa STATISTICA para Windows 1995 y realizando las siguientes pruebas: T de muestras dependientes, homogeneidad de varianza de Bartlett X_i^2 , ANDEVA, Tukey, Regresión lineal y de estadística descriptiva, con el apoyo del Biól. Oscar Trujillo Mendoza y la bibliografía pertinente, (Celis, 2004; Daniel, 2002; Pérez y Abaira, 1996 y Vera, 1994).

5.3. Análisis histológico de nudos, callos y primordios de *Cucumis melo* L. var. *inodorus* tipo honey dew provenientes del cultivo *in vitro*.

El trabajo del análisis histológico se desarrolló en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias con la asesoría en interpretación y obtención de imágenes de la Dra. Judith Márquez Guzmán y la asesoría técnica de la M. en C. Lourdes López Curto y la Dra. Clara Esquivel Huesca.

5.3.1. Elección de muestras provenientes del cultivo *in vitro*.

El material en el análisis histológico provino del medio MS-II debido a su alta proliferación y formación de brotes. Se trabajó con 10 nudo de 8 semanas de edad provenientes de plantas de semilla botánica, nombrados tiempo cero (T_0); diez agregados de callo en un desarrollo de entre seis y ocho semanas llamados tiempo uno (T_1), se eligió esta edad por encontrarse en un punto medio de desarrollo, es decir, entre el explante y la aparición de brotes; por último el tiempo 2 (T_2) con diez agregados de callo con presencia del inicio de formación de brotes, con una edad de quince a veinte semanas. El material biológico empleado en esta parte se presenta en la siguiente Figura 4-6.

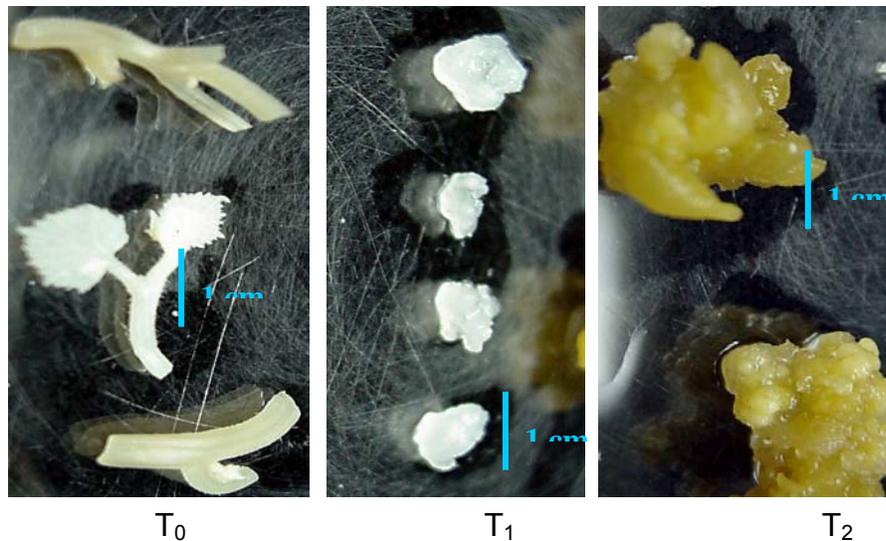


Figura 5.6. Material proveniente de *in vitro*, trabajado en el análisis histológico, T_0 explante de nudo, T_1 agregados de callo y T_2 inicio de la formación de brotes

5.3.2. Procesamiento de muestras.

Después del proceso de fijación, el material se preteñó con azul de toluidina al 0.5% con la finalidad de facilitar la orientación en el proceso de la inclusión. Posteriormente las muestras se deshidrataron con alcohol etílico gradual aplicado en concentraciones porcentuales en orden ascendente 30%, 50%, 70% y 85%, dos cambios en alcohol etílico 96% y por último tres

cambios de alcohol etílico al 100%, cada cambio tuvo una duración de doce horas con excepción del alcohol 96% que fue de seis horas y alcohol al 100% de tres horas cada uno.

El material correspondiente al T_0 se trabajó con la técnica de Paraplast y los tiempos T_1 y T_2 con la técnica de LR-White, debido a que estos dos tiempos estaban sobre hidratados y se necesitaba un corte mucho más fino menor a 4 micras para observar sus estructuras.

Después del proceso de deshidratación, las muestras del T_0 se colocaron en una mezcla de Xilol-Paraplast (2:1) por 48 horas, seguido de Xilol-Paraplast (1:1) por 72 horas y finalmente en Paraplast puro por 48 horas como mínimo; todas las mezclas se mantuvieron a 56°C; se continuó con la inclusión en moldes cuidando la orientación de las muestras, hasta que se endurecieran a temperatura ambiente y poder desmoldar (48 hrs. aprox.) Las muestras correspondientes al T_1 y T_2 se trabajaron con la técnica LR-White posterior a la deshidratación, las cuales se colocaron en mezclas de alcohol etílico al 100% y LR-White en diferentes porcentajes en orden ascendente (25%, 50%, 75%) por 48 horas y LR-White 100% por 72 horas, y se mantuvieron en refrigeración para evitar su polimerización; finalmente se incluyeron en cápsulas número 2 y 4 cuidando la orientación de las muestras y se dejaron por 24 horas a 56°C para el endurecimiento de la resina, (López-Curto, *et al.*, 1998).

5.3.3. Obtención de cortes, laminillas.y observaciones en el microscopio óptico.

Las muestras incluidas en Paraplast se cortaron en un microtomo de rotación de 5-8 μm y el material incluido en LR-White en un ultramicrotomo de 2-4 μm .

Los mejores cortes en LR-White se tiñeron con azul de toluidina al 0.5% y los de Paraplast con la técnica safranina (metilcelosolve) - verde rápido (ver anexo).

6. RESULTADOS

6.1. Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Cucumis melo* L. var. *inodorus* tipo honey dew y su regeneración.

6.1.1. Germinación de semillas bajo condiciones asépticas.

Para la desinfección de las semillas se probaron cinco tratamientos, donde los tratamientos 1, 2 y 3 muestran una contaminación por bacterias y hongos mayor al 85%, mientras que en el tratamiento 4 la contaminación disminuye al 69% y esta ocasionada por hongos. El quinto tratamiento en el que se probó la exposición al fungicida Benlate[®], fue el que resultó tener mayor éxito, presentando el más alto porcentaje de germinación y obtención de plántulas, esto es del 86% y 82% respectivamente y un 14% de contaminación, siendo el menor porcentaje, los resultados se presentan en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Resultados de los diferentes tratamientos de desinfección de semillas de *C. melo*.

	TRATAMIENTOS				
Observaciones	1	2	3	4	5
total semillas sembradas	50	50	50	137	156
Contaminación (%)	100	96	87	69	14
Sin germinar (%)	100	100	100	8	4
Germinación (%)	0	0	0	92	86
Plántulas (%)	0	0	0	17.5	82
Oxidación (%)	0	0	0	23	0
Efectividad (%)	0	0	0	5.1	58

En la Figura 6.1 se observa un estado de la germinación, crecimiento y desarrollo de plántulas obtenidas en el tratamiento 5; en la Figura 6.1 a se aprecia los germinados de las semillas, las cuales están libres de patógenos

y emergiendo la radícula, mientras que en la Figura 6.1 b se destaca la presencia de las plántulas después de la germinación, asimismo en la Figura 6.1 c se observa una planta ya en desarrollo, de la cual se obtienen los explantes.

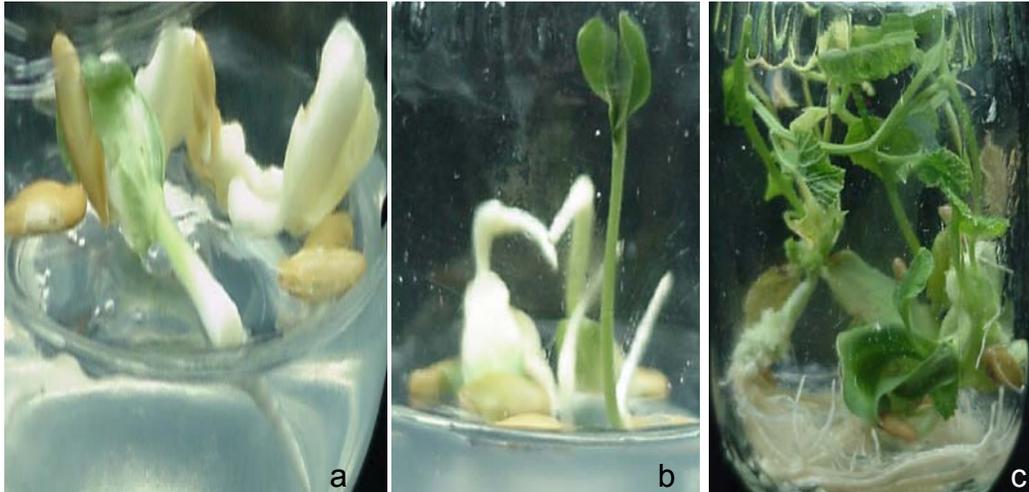


Figura 6.1. a) germinación de semillas, b) desarrollo del hipocótilo y c) desarrollo de plántula (Tratamiento 5).

6.1.2. Establecimiento de callos, inducción y proliferación; regeneración y enraizamiento de brotes.

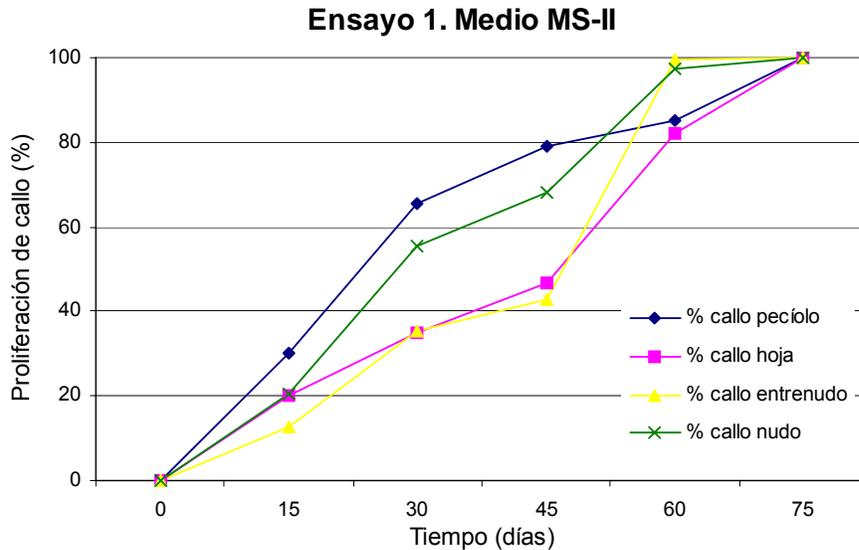
Esta etapa tuvo la finalidad de encontrar el medio de cultivo y tipo de explante que favorecieran la inducción de callo, la regeneración de brotes y su enraizamiento.

Ensayo 1. Inducción y proliferación de callos.

En este ensayo se probaron tres medios diferentes en cuanto a sales orgánicas y reguladores de crecimiento (MS-II, Myt y SH) y cuatro explantes diferentes (hoja, pecíolo, entrenudo y nudo).

Los resultados obtenidos al probar los tres medios de cultivo con los cuatro explantes, se evaluaron tomando en cuenta la proliferación de callo (%) a través del tiempo (días).

En la inducción de callo probada en el medio MS-II, se observó que la mayor inducción de callo en los 45 días después de la siembra, la presenta el explante de pecíolo; pero en los últimos días (del 60 al 75), el nudo y entrenudo, que tienen un comportamiento similar, llegan antes que el pecíolo a una producción de callo del 100%, los resultados se pueden apreciar en la Gráfica 6.1.



Gráfica 6.1. Proliferación de callo para MS-II.

Se puede decir que los cuatro explantes tienen la capacidad de producir callos en el medio MS-II, sin embargo al realizar observaciones del estado físico del callo, se pudo detectar que éste medio presentó menor tejido oxidado. El pecíolo tuvo un alto porcentaje en proliferación, el callo producido por el nudo presentó una consistencia compacta, color verde brillante, comparado con el callo proveniente de pecíolo, el cual fue friable y con una coloración verde menos brillante, el explante de nudo produjo más callo en comparación con el explante de pecíolo, tal como se muestra en la Figura 6.2.

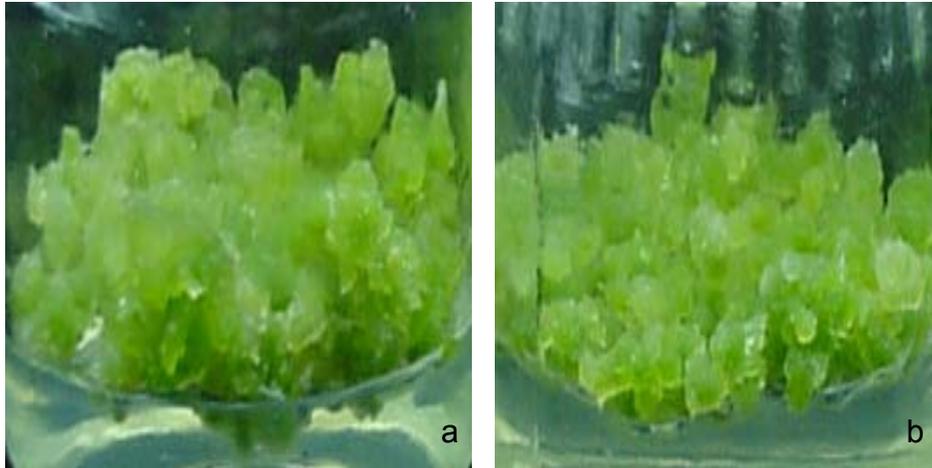
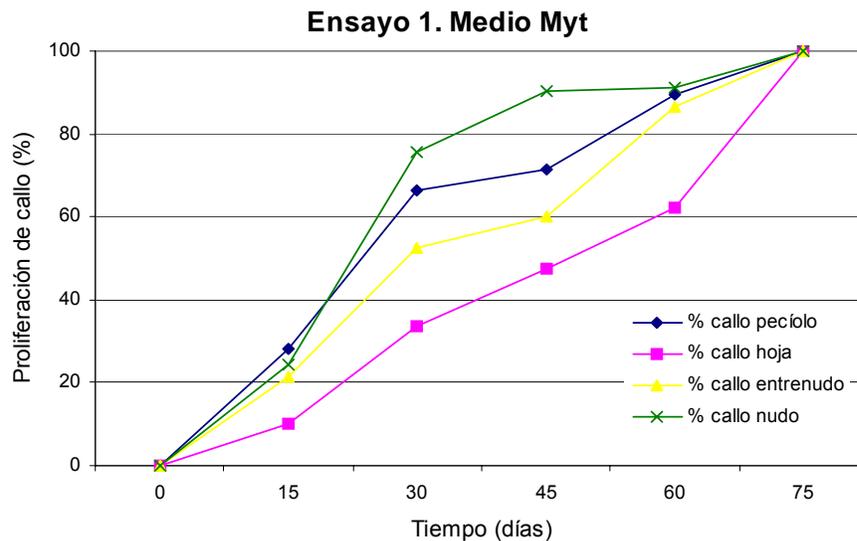


Figura 6.2. Callo de nudo (a) y de pecíolo (b), del medio MS-II a las 13 semanas de cultivo.

En el caso del medio Myt, el explante de nudo a partir del día 22 de siembra hasta el día 60, muestra una proliferación de callo mayor que el resto de los explantes; el explante de pecíolo presenta menos producción, seguido del explante de entrenudo y por ultimo el de hoja que presentó la proliferación más baja en el mismo periodo, que se puede apreciar en la Gráfica 6.2.



Gráfica 6.2. Inducción y proliferación de callo para Myt.

En la siguiente Figura 6.3 se muestra la proliferación de callo correspondiente al explante de nudo 6.3 a y de pecíolo 6.3 b. No se puede

aprecia una diferencia entre ellos, ambos se muestran poco compactos y de una coloración verde muy clara con manchones amarillos y poco oxidados.

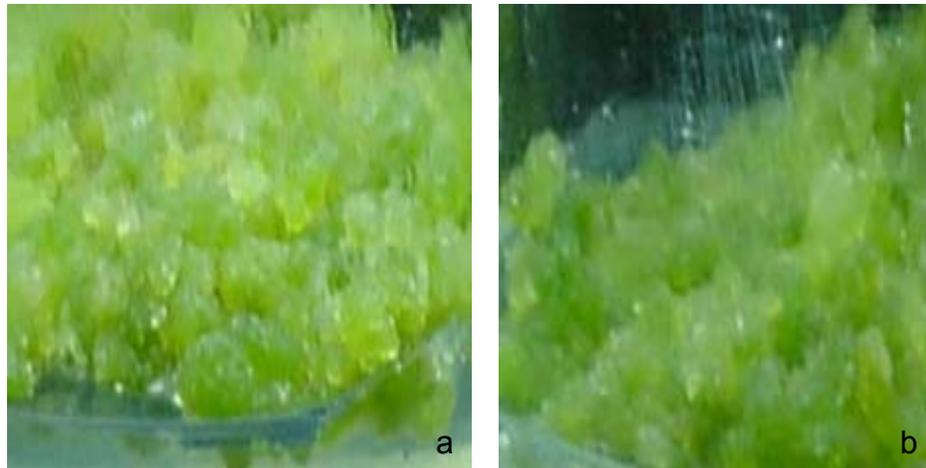
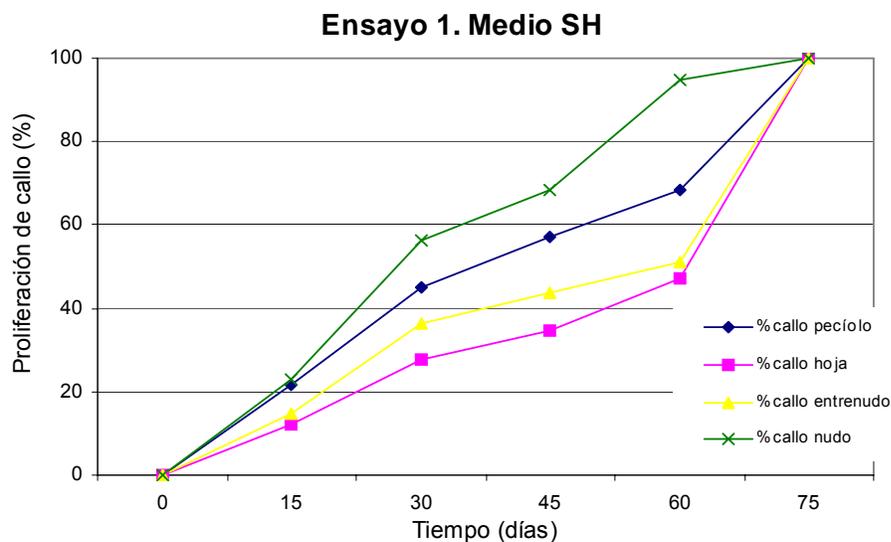


Figura 6.3. Callo de nudo (a) y de pecíolo (b), del medio Myt a las 13 semanas de cultivo.

Para el último experimento del ensayo 1 de proliferación, realizado en el medio SH, se observa que el nudo resultó ser el explante con mayor producción de callo, dado que el incremento es superior desde el día 15 hasta el día 75, seguido del pecíolo, entrenudo y hoja (ver la Gráfica 6.3).



Gráfica 5-3. Inducción y proliferación de callo para SH.

En la siguiente Figura 6.4, se muestra el callo del pecíolo y nudo, en la cual se observa que existe más producción de callo en el nudo, aunque en ambos casos esta presente la oxidación visible por la coloración, el callo tiene una consistencia de friabilidad y una coloración amarillo-verdoso.

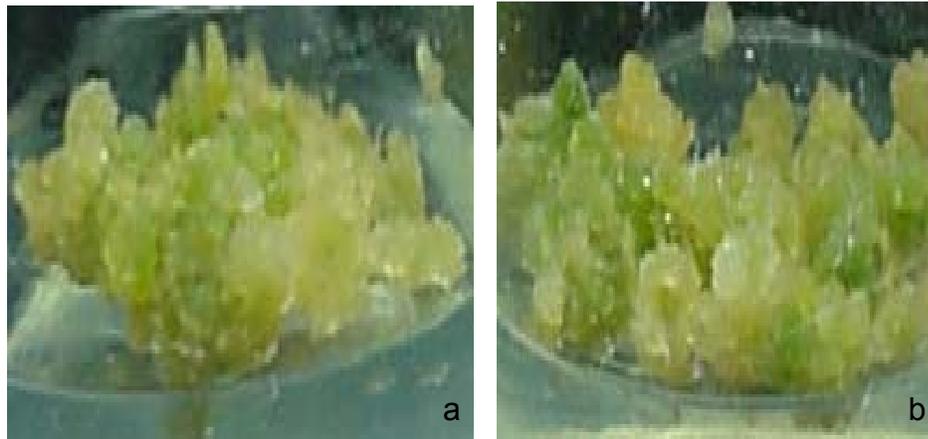
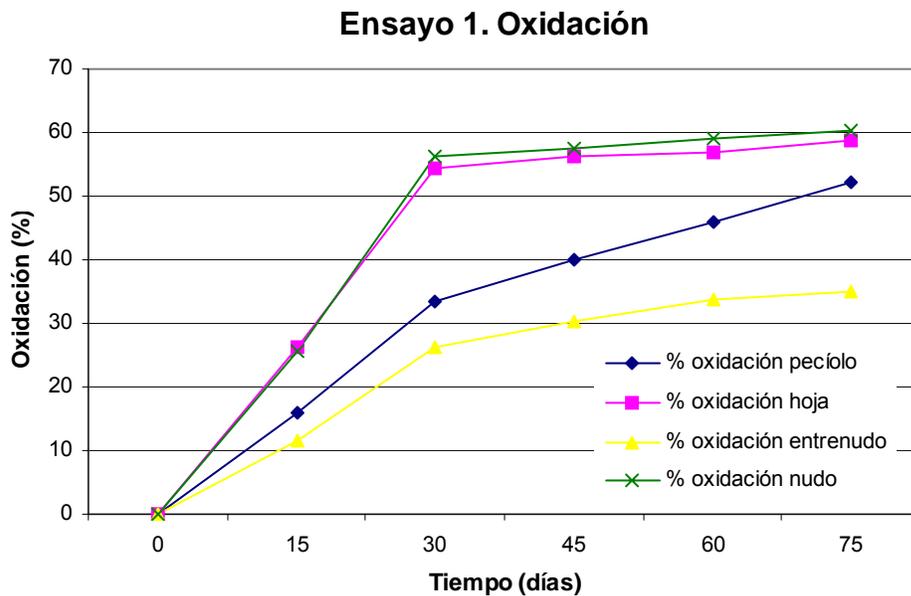


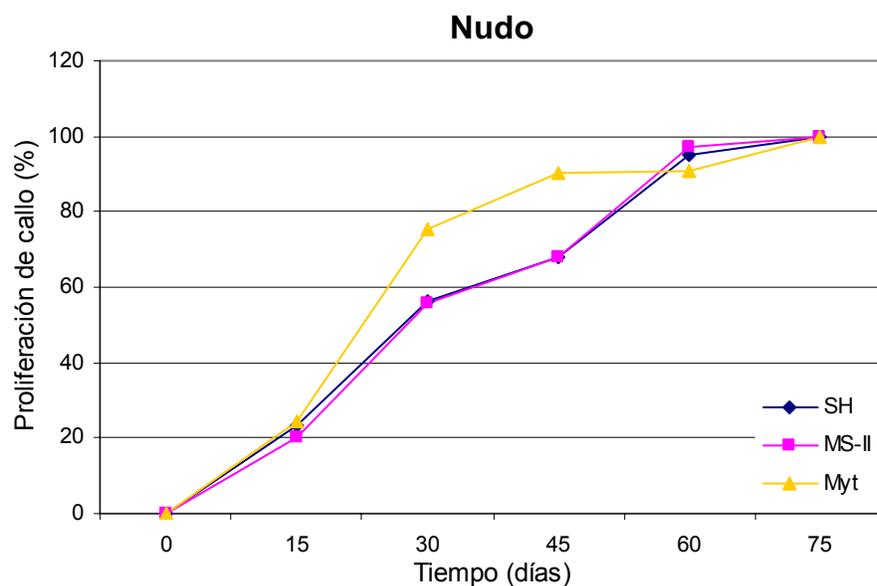
Figura 6.4. Callo de nudo (a) y de pecíolo (b), del medio SH a las 13 semanas de cultivo.

En las observaciones realizadas a lo largo del ensayo 1, se apreció que la oxidación en el medio SH aumentó de una forma muy acelerada en los cuatro explantes, desde el día en que se inocularon hasta el día 30, después de éste día, la oxidación se comenzó a estabilizar gracias a que el callo proveniente de los cuatro explantes se subcultivo con mayor frecuencia que en los otros dos tratamientos (cada 14 días), lo que permitió tener un mayor control de la oxidación, sin embargo, no se evitó. La oxidación se observa más acentuada en nudo y hoja, disminuyendo en pecíolo y entrenudo, cabe mencionar que la oxidación se evaluó por porcentajes como el caso de la proliferación de callo. Las observaciones de oxidación son mostradas en la Gráfica 6.4.



Gráfica 6.4. Oxidación presentada en todos los explantes cultivados en el medio en SH.

Al comparar los cuatro explantes en un solo medio ya se MS-II, Myt o SH, no se distinguen diferencias significativas en cuanto a la proliferación de callos, sin embargo al comparar un solo explante en los tres medio, se pudo distinguir que si hay diferencias, principalmente en el explante de nudo, mostrando que los medios MS-II y SH presentan un mismo comportamiento, mientras que en el medio Myt, se observa una proliferación más alta a partir del día 15 hasta el día 60 después de la siembra. Sin embargo, la oxidación presente en el medio SH provocó que se eliminara. Ver la Gráfica 6.5



Gráfica 6.5. Inducción y proliferación de callo de nudo en tres medios de cultivo diferentes.

Para poder elegir los medios de cultivo y el explante óptimo para el ensayo 2, se tomó en cuenta características como: coloración del callo, friabilidad, capacidad regenerativa y oxidación, además de los datos ya antes mencionados.

El callo en general mostró coloraciones verdes brillantes o solo verdes siempre y cuando estuviera sano, sin oxidación, la presencia de ésta se identificó por la coloración amarilla, amarilla verdosa o casi café. La friabilidad también conocida disgregación, se notó al hacer los subcultivos, ya que al tomar los agregados de callo, éstos se separaban con facilidad, y por último, la capacidad regenerativa se identificó contando los brotes que aparecieron sobre los agregados de callo los cuales fueron eliminados. Las características antes mencionadas, se muestran en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Características de los callos provenientes de diferentes explantes obtenidos en distintos medios.

medio explante	MS-II	Myt	SH
hoja	C: verde-amarillo F: alta CR: nula O: media-alta	C: amarillo-verde F: alta CR: nula O: alta	C: amarillo F: alta CR: nula O: muy alta
pecíolo	C: verde poco intenso F: media CR: nula O: baja	C: verde F: media-alta CR: nula O: baja	C: amarillo-verde F: muy alta CR: nula O: alta
entrenudo	C: verde F: alta CR: nula O: baja	C: verde F: alta CR: nula O: baja	C: verde-amarillo F: alta CR: nula O: alta
nudo	C: verde intenso F: baja CR: alta O: baja	C: verde F: media-baja CR: baja-nula O: baja	C: amarillo-verde F: alta CR: nula O: alta

C: coloración F: friabilidad CR: capacidad regenerativa O: oxidación.

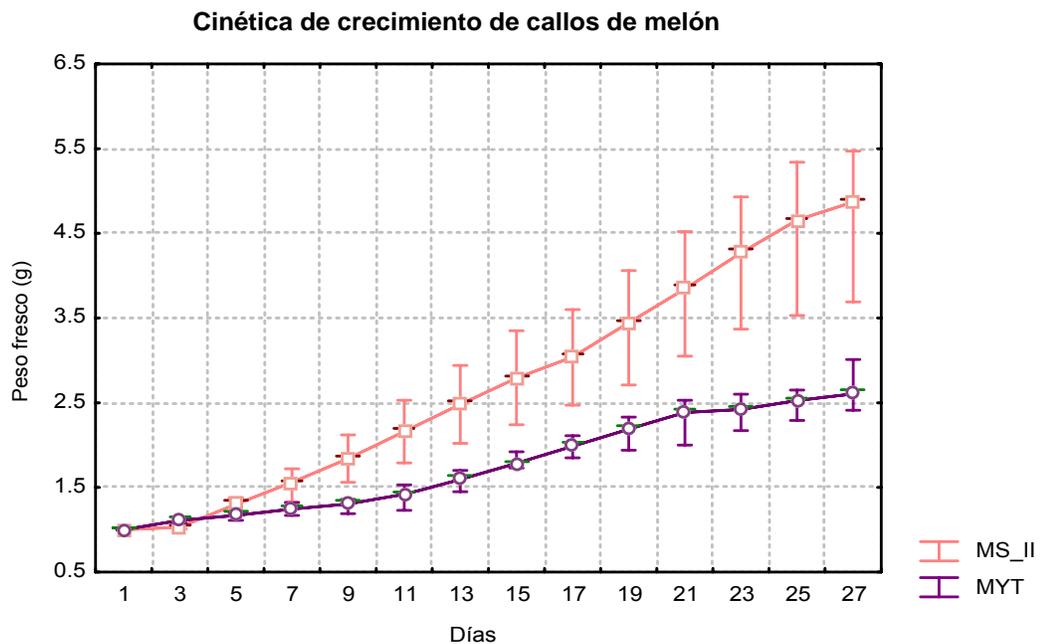
Ensayo 2. Inducción, proliferación y cinética de crecimiento de callos.

Se trabajó con el medio MS-II y el medio Myt, tomando como explante el nudo por presentar un callo más prolífero.

En la cinética de crecimiento se observa que existen dos fases en el crecimiento de los callos de melón, una de ellas es la fase exponencial, que es donde existe un aumento de peso y por consiguiente de producción de callo, estando presente la mayor actividad de división celular y otra fase poco visible llamada fase de desaceleración que es donde disminuye la velocidad de crecimiento de callo y la división celular. Cabe mencionar que en esta cinética no se presentó la llamada fase lag, la etapa de adaptación al medio.

El promedio del peso de los callos cultivados en el medio MS-II presentaron un incremento de su peso al doble a partir del día 13, donde se aprecia, mientras que para los promedios del medio Myt, el callo aumentó su peso hasta el día 19 posterior a su inoculación, por lo que se puede decir que

el callo más prolifero y con mayor capacidad para regenerarse en menor tiempo es el callo proveniente del medio MS-II, presentando al final del periodo en el que se midió la cinética de crecimiento una diferencia de peso de casi el 50% más que el presentado por el callo cultivado en el medio Myt, mientras que los callos de Myt, pesaban 2.6 g en promedio, los callos del medio MS-II registraron un peso fresco promedio final de 4.6 g (Ver Gráfica 6.6).



Grafica 6.6. Cinética de crecimiento de callos de nudo en los medios MS-II y Myt.

Para explicar la eficiencia de cada medio se realizaron las siguientes pruebas estadísticas, con un índice de confianza del 95% para todas ellas, empleando el programa STATISTICA para Windows, 1995.

Prueba de T de muestras dependientes. La prueba se realizó con los datos obtenidos en la cinética de crecimiento; la prueba resalta cual es el día en que los datos del medio MS-II tuvieron aproximadamente el mismo valor

en el medio Myt, de esta forma la prueba hace notar que el medio MS-II presenta mayor proliferación de callo que Myt,

A continuación se presenta el resumen de la prueba de T de muestra dependientes, (Tabla 6.3), en la tabla se comparan los dos medios, el eje de lectura es la primera fila correspondiente al medio MS-II, donde se ven los días en que se registran los datos, del 1 al 27 y el valor del peso en gramos que obtuvo el callo, éstos se comparan con la segunda fila que es la correspondiente al medio Myt. Se observa que el medio MS-II en el día 5 tuvo un peso promedio de 1.292 g, mientras que el medio Myt hasta el día 9, alcanza un peso muy parecido igual a 1.291 g; lo mismo ocurre con el día 7 de MS-II, donde su peso es muy parecido al del día 13 de Myt.

El día 15 de MS-II tiene como valor 2.726 g, el cual es alcanzado por el medio Myt hasta el día 27, con lo que podemos asegurar que el medio MS-II es el más eficaz para la proliferación de callo. Los resultados completos se muestran en la Tabla 15 de anexos resaltando en color rojo los valores significativos.

Tabla 6.3. Resumen de Prueba de T de Muestras Dependientes.

MS-II										
Día = peso (g)	5=1.292	7=1.556	9=1.851	11=2.14	13=2.431	15=2.726				
Myt										
Día = peso (g)	9=1.291	13=1.582	15=1.794	17=1.993	17=1.993	19=2.186	21=2.363	23=2.431	25=2.511	27=2.605

La prueba de Homogeneidad de Varianza de Bartlett X_i^2 , muestra que el medio MS-II tiene un porcentaje de homogeneidad del 98.30%, el cual es mucho más homogéneo y efectivo, en cuanto al crecimiento de callo comparado con el medio Myt con un porcentaje de homogeneidad del 48.42% (Tabla 16 de anexos).

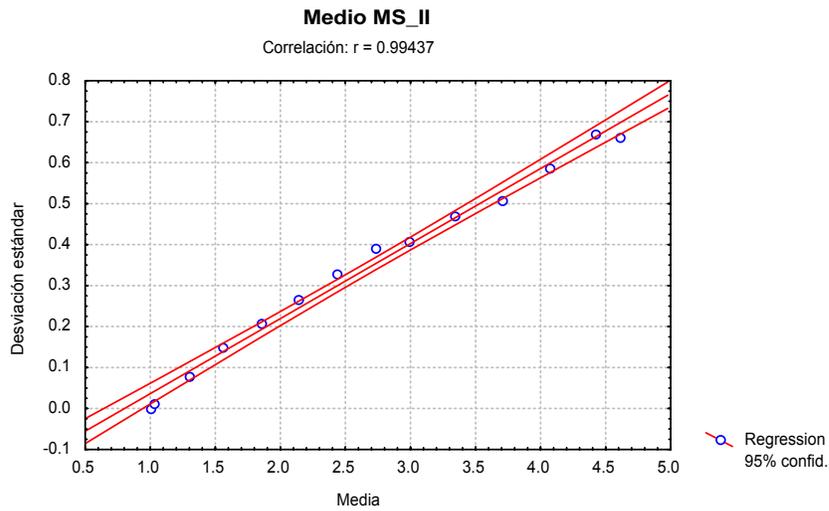
ANDEVA O ANOVA, Prueba de F. La prueba de análisis de varianza con el valor de p menor a 0.05, hace notar valores significativos, la F de tablas para ambos medios es de 1.70, en los dos casos menor que la calculada, por lo que se puede asegurar que hay diferencias significativas en el crecimiento de callo de ambos medios (MS-II y Myt) (Tabla 17 de anexos).

La Prueba de Tukey. Mediante esta prueba se identifica la velocidad de crecimiento celular y las fases, en la tabla de resultados correspondiente al medio MS-II se observa que el crecimiento en los días 1 al 17 corresponde a un crecimiento lento, pero gradual, donde no hay una importante diferencia comprado con los días 21, 23 y 25, donde se nota un crecimiento acelerado en cuanto a peso que, pasando al día 27 este crecimiento de desacelera, volviendo a ser menor (Tabla 18 de anexos).

Con lo que respecta a la tabla del medio Myt, se distingue que los días 1 al 11 el crecimiento es constante, no existe un aumento significativo en el peso de los callos, a partir del día 12, los callos disparan su crecimiento, volviéndose acelerado hasta el día 19 y desacelerando el crecimiento a partir del día 21. (Tabla 19 de anexos)

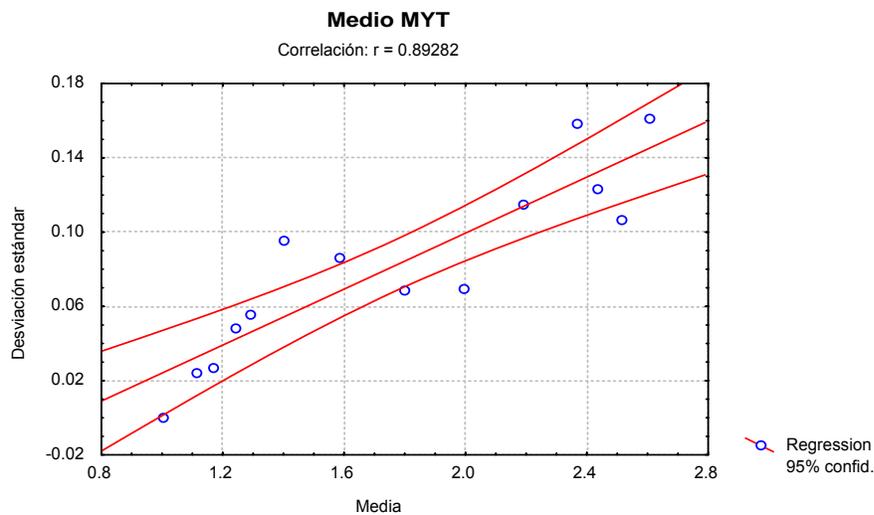
En ésta prueba se evaluó que tanta homogeneidad presenta el crecimiento de callo con respecto a su peso fresco, que tanto un día de registro de peso, se parece a otro, señala valores que representan mayor crecimiento (negro) y valores de menor crecimiento (rojo); datos que se puede ver en la Tabla 18 y 19 de anexos.

Regresión lineal. Esta prueba se aplico a los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento: medios MS-II y Myt y callos del nudo; encontrándose que en el medio MS-II la correlación media & desviación estándar es $r = 0.994$ lo que evidencia que es un medio de cultivo exitoso en la proliferación de callo, que puede tomarse como un modelo predecible tanto intrapoblacional como extrapoblacional (ver Gráfica 6.7).



Gráfica 6.7. Regresión lineal en el medio MS-II.

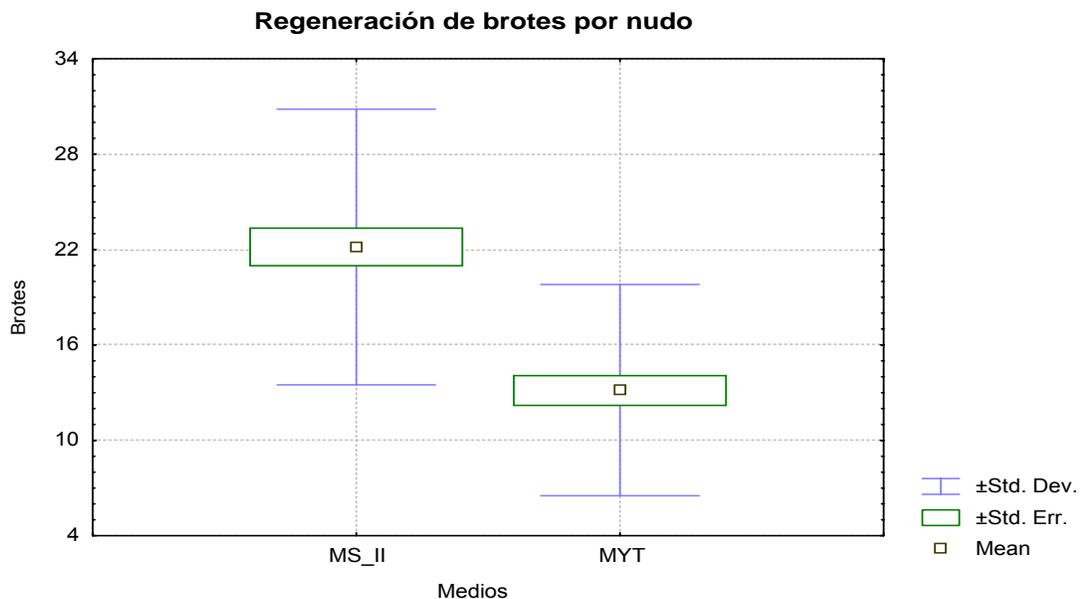
En el medio Myt, se observa una correlación menor, $r = 0.892$, lo que muestra que no es muy predecible el comportamiento de los callos respecto a su proliferación (ver Gráfica 6.8)



Gráfica 6.8. Regresión lineal en el medio Myt.

Regeneración.

La mayor regeneración de brotes se encuentra en el medio MS-II obteniendo casi el doble en comparación con el medio Myt. En el medio MS-II se sembraron 84 nudos los cuales produjeron en promedio 21.667 \approx 22 brotes cada uno, la estadística descriptiva (Tabla 20 de anexos) mostró un índice de confianza $-95\% = 19.925$ y un índice de confianza $+95\% = 23.408$, con una desviación estándar de ± 8.024 . Cada nudo cultivado en medio Myt dio en promedio 13.16 \approx 13 brotes, con un total de 50 nudos sembrados, el índice de confianza $-95\% = 11.272$ y un índice de confianza $+95\% = 15.047$, con una desviación estándar de ± 6.640 , estos resultados se pueden observar en la representación estadística de la Gráfica 6.9.



Grafica 6.9. Número de brotes obtenidos por nudo, en los medios MS-II y Myt.

Después de haberse quitado por completo los reguladores de crecimiento a los medios, transcurrieron 4 semanas para que en los agregados de callo comenzarán a observarse la presencia de estructuras diferentes a las células de callo, a las 24 semanas de edad se identificaron

primordios foliares, registrándose así la presencia de primordios de brotes, los cuales pueden ser observados en la Figura 6.5.

En las fotografías, se observa tres etapas del proceso de formación y desarrollo de brotes provenientes de los nudos cultivados en medio MS-II, en la Figura 6.5 a, se ve la formación de los brotes sobre agregados de callo de apariencia compacta, donde destaca la presencia de primordios, en la Figura 6.5 b se muestra un acercamiento de primordios de brotes, en la Figura 6.5 c, se observa un mayor desarrollo en esos primordios, apreciándose pequeñas hojas y por último en la Figura 6.5 d, un brote con un tallo ya formado y hojas completas.

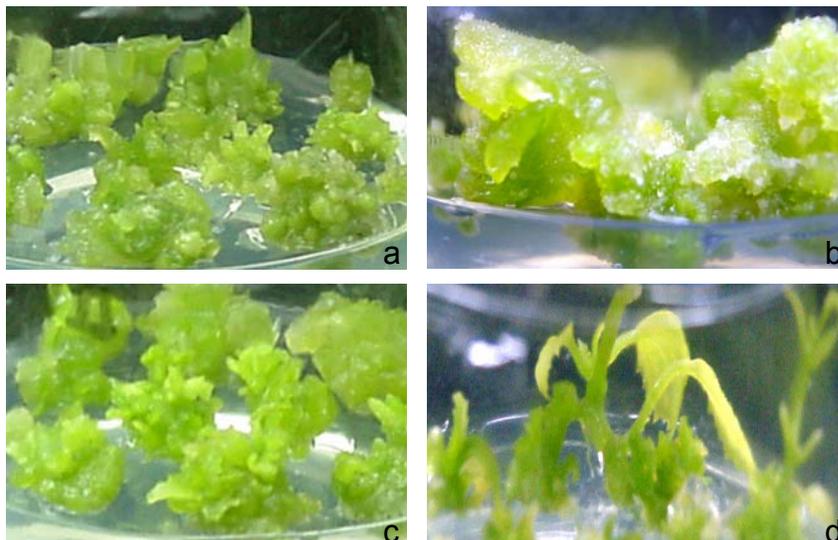


Figura 6.5. Primordios y brotes provenientes de nudos cultivados en MS-II.

Enraizamiento. A los cuatro meses y medio que se sembraron los nudos en los dos diferentes medios MS-II y Myt ya presentaban brotes, los cuales se colocaron en medio MS con 2 mg l^{-1} de la auxina AIA, nombrado medio MS-III, con el fin de inducir la formación de raíces. Al mes de haberse colocado estos brotes en el medio MS-III comenzaron a emerger las raíces, tal como se muestra en la Figura 6.6.



Figura 6.6. Brotes enraizados, provenientes de nudo del medio MS-II.

6.2. Análisis histológico de nudos, callos y primordios de *Cucumis melo* L. var. *inodorus* tipo honey dew provenientes del cultivo *in vitro*.

6.2.1. Obtención e interpretación de cortes histológicos.

Para el estudio de las respuestas morfogénicas obtenidas del cultivo *in vitro* del melón se trabajó con tres tiempos del desarrollo *in vitro*, T₀ correspondiente al explante de nudo, T₁ etapa de callo y T₂ desarrollo de brotes.

En el T₀ los nudos muestran la presencia de yemas axilares preexistentes, tal como se puede observar en la Lámina 6.1 donde se observan áreas meristemáticas.

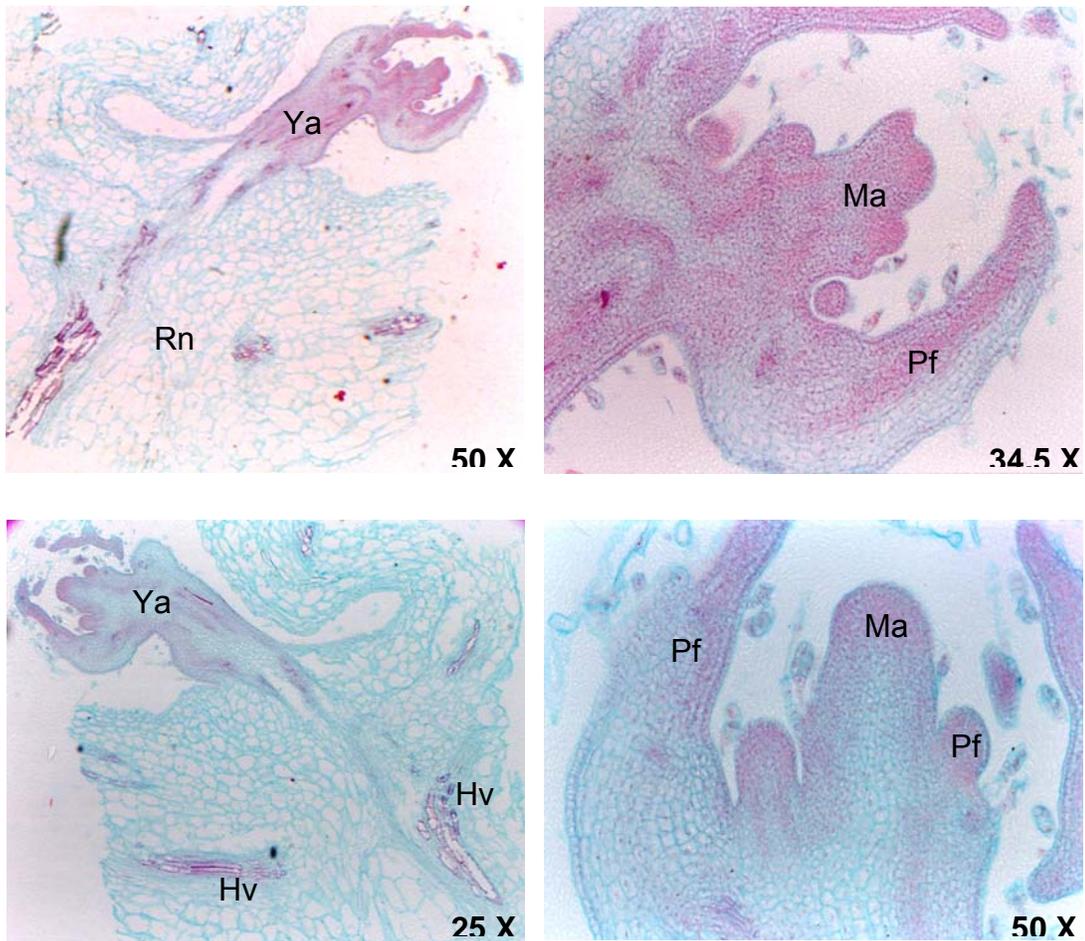


Lámina 6.1. Yemas axilares de la región del nudo de plantas jóvenes de *Cucumis melo* L. T₀. Yemas axilares (Ya), Región de nudo (Rn), Meristemo apical (Ma), Primordios foliares (Pf) y Haces vasculares (Hv), con tinción verde-rápido en metilcelosolve.

En el tiempo uno, (T_1) se puede observar el desarrollo de células de callo, algunas con la presencia de vacuolas, núcleos, nucleolos y citoplasma y por otro lado algunas óptimamente vacías, como se muestra en la Lámina 6.2.

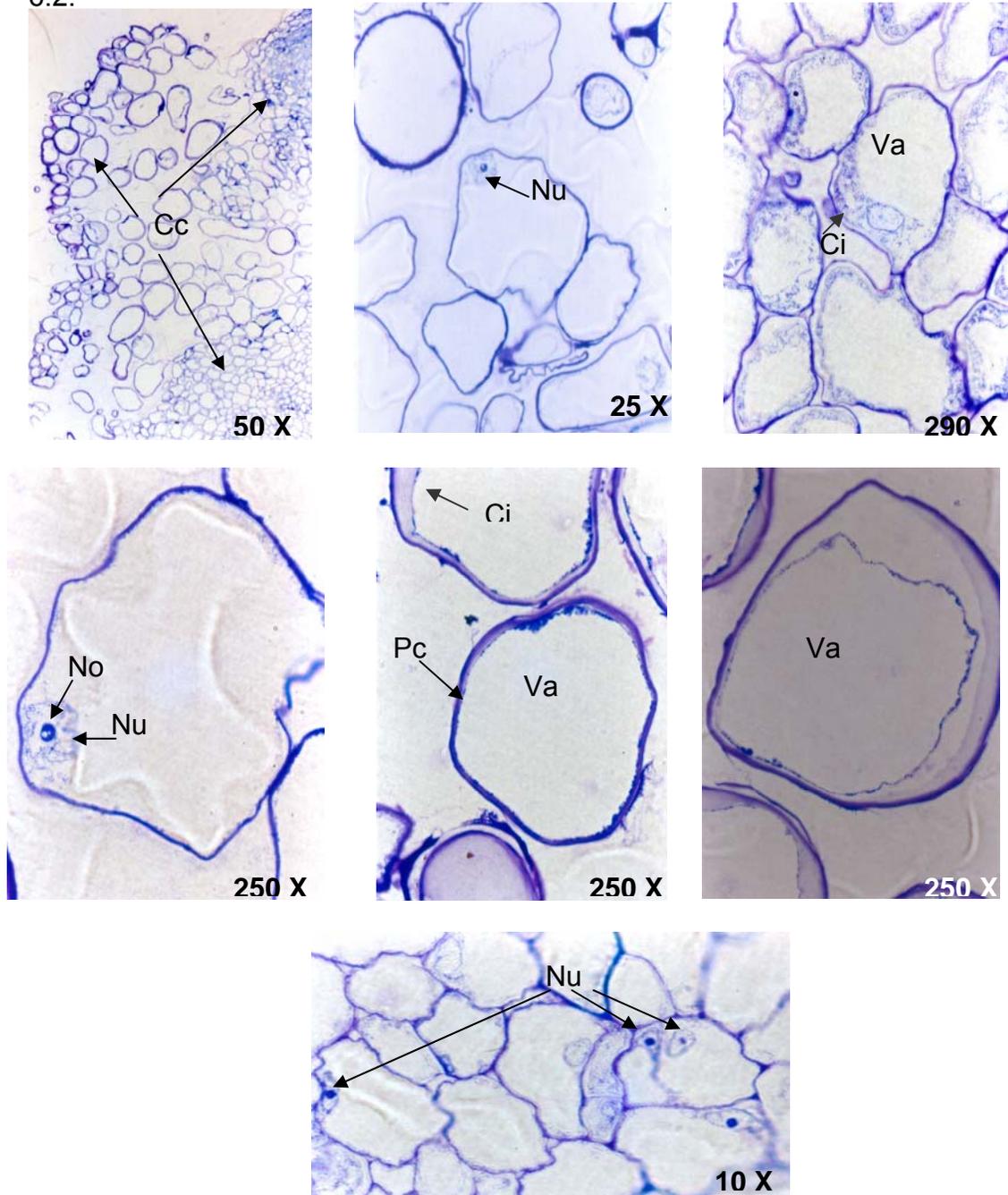


Lámina 6.2. Células de callo de *Cucumis melo* L. T_1 . Células de callo (Cc), Núcleo (Nu), Vacuola (Va), Citoplasma (Ci), Nucleolo (No), Pared celular (Pc), con tinción azul de toluidina.

En las siguientes láminas 6.3, 6.4 y 6.5 se evidencia la formación de órganos de manera indirecta (organogénesis indirecta), gracias a la presencia del proceso de formación de meristemas, de división celular originando epidermización, de la formación de primordios foliares, haces vasculares y de raíces.

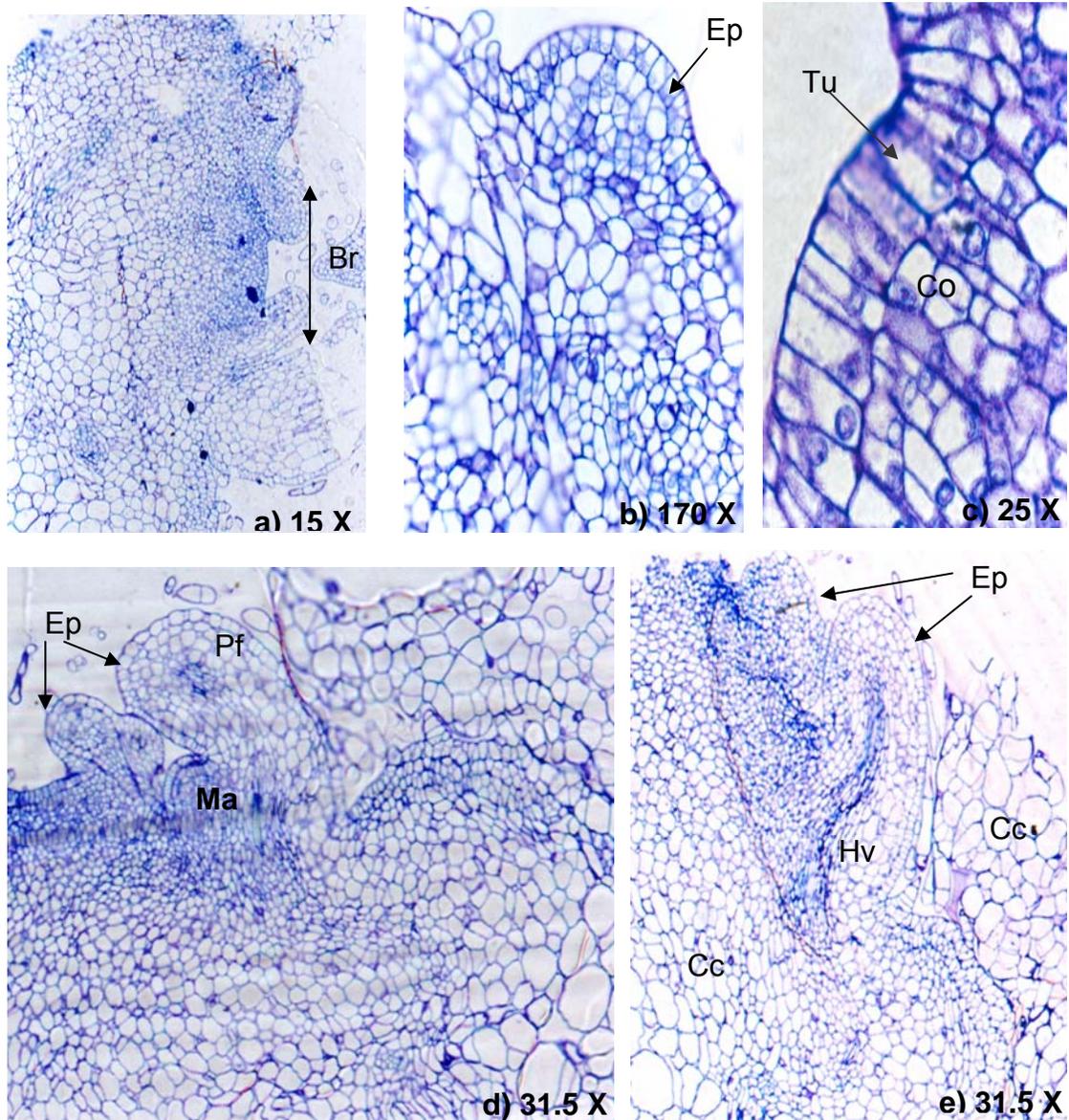


Lámina 6.3. Organogénesis indirecta. T₂. a) Formación de brotes (Br) con primordios foliares (Pf), Meristemo apical (Ma); b) Formación de epidermis (Ep) en brotes; c) Meristemo apical con organización Túnica (Tu) - Córpus (Co); d y e) Formación de brotes que surgen del callo (Cc). Se observa el surgimiento de novo de haces vasculares (Hv), con tinción azul de toluidina.

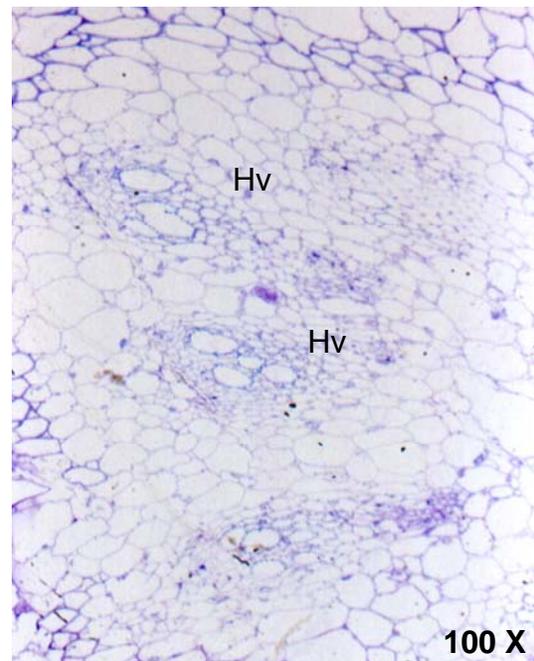
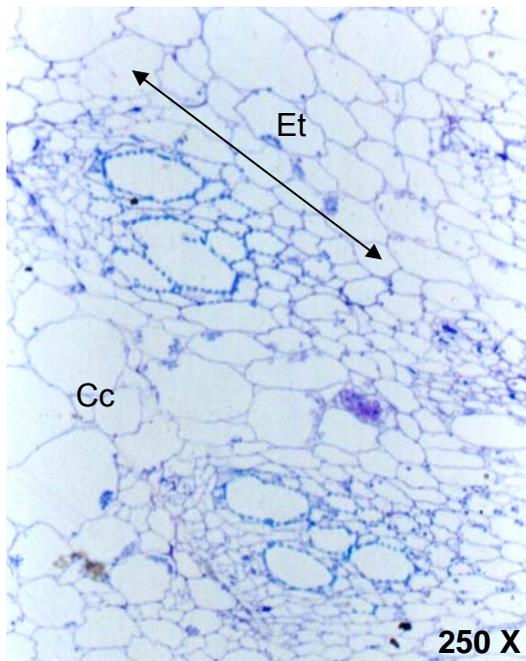
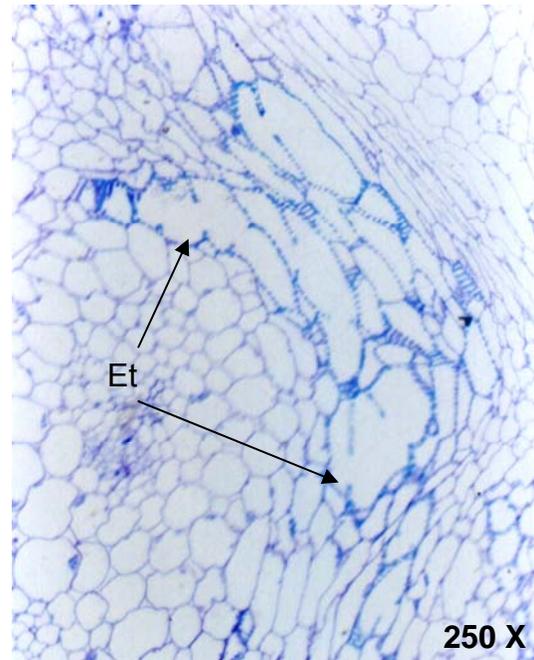
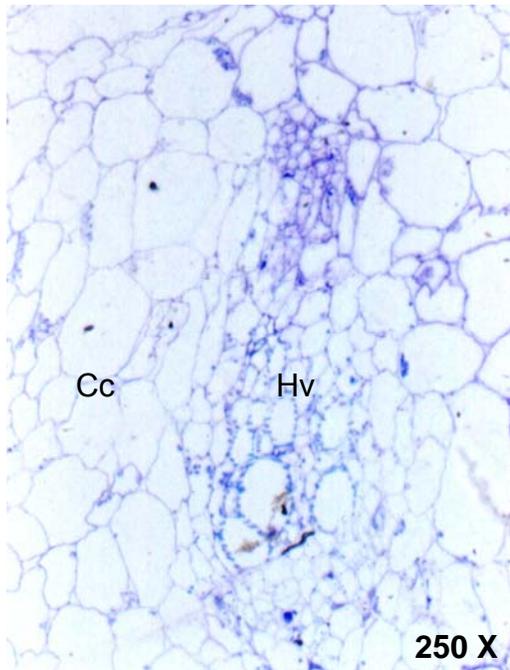


Lámina 6.4. Haces vasculares. Formación de novo. T₂. Elementos traqueales (Et) que surgen a partir de células de callo (Cc) formando cordones de haces vasculares (Hv), con tinción azul de toluidina.

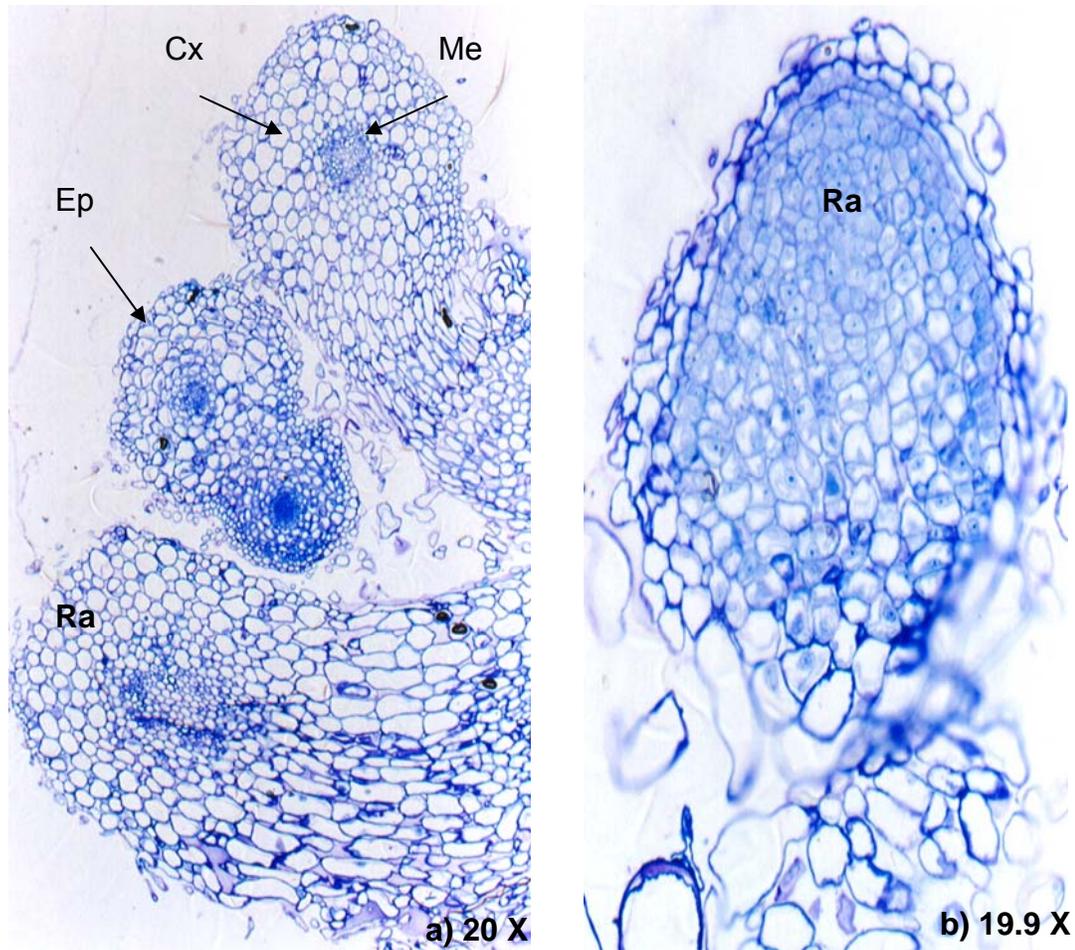


Lámina 6.5. Formación de raíces. T₂. Corte transversal, oblicuo y longitudinal de raíces (Ra). a) Cortes transversales y oblicuos de primordios de raíz (Ra). Se aprecian estructuras de Médula (Me), Córtex (Cx) y Epidermis (Ep). b) Corte longitudinal de un primordio de raíz (Ra), con tinción azul de toluidina.

Posible hipótesis que podría servir para futuras investigaciones.

Aunque la figura de la Lámina 6.6. no esta del todo completa, se piensa en la posibilidad de la formación de embriones somáticos vía embriogénesis indirecta, debido a que se encontraron imágenes donde se observa un elevado desarrollo morfológico, donde las células ya no parecen ser las de callo, ni las anteriores presentadas, sino las de células que dan formación a un embrión (CE), se aprecia un estrechamiento (Es), la formación de un cuello que hace distinguir dos estructuras diferentes (la del embrión derecha y otra izquierda), un proceso de epidermización (Ep) muy desarrollado; tomando en cuenta todas estas estructuras se puede completar la imagen de forma hipotética, pensando que existe la presencia de cotiledones en un elevado desarrollo.

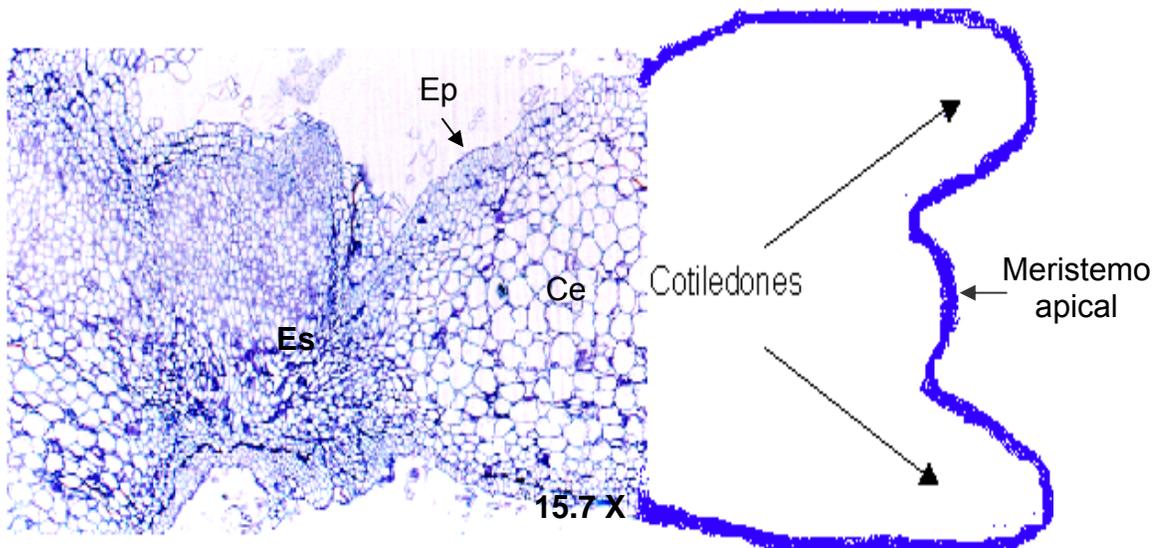


Lámina 6.6. Embriogénesis indirecta. Posible formación de embrión en etapas muy avanzadas del desarrollo a partir del callo. T₂. Tinción azul de toluidina.

7. DISCUSIÓN

Germinación de semillas bajo condiciones asépticas.

La desinfección química llevada a cabo por diferentes sustancias, resultó ser un proceso largo debido a la dificultad para eliminar bacterias y hongos provenientes del interior de las semillas. De acuerdo con los resultados obtenidos, el mejor tratamiento de desinfección de semillas de *C. melo* fue el tratamiento 5, demostrándose que a mayor concentración y tiempo de exposición a los agentes químicos como etanol, cloro, Tween 20, Microdyn[®], la utilización de un fungicida y un bactericida, así como la adición de un antibiótico al medio de cultivo y escarificación de la semilla, permitieron la germinación de las mismas bajo condiciones asépticas.

Lo anterior se debe a factores físicos y químicos tales como la agitación, adición de agentes desinfectantes y adición de antibióticos, tanto en el proceso de desinfección como en el medio de cultivo, tienen efectos determinantes e intensos en todas las actividades de los microorganismos.

A este respecto, Alvarado (1988) hace notar que los contaminantes más frecuentes en el cultivo *in vitro* son hongos filamentosos y bacterias. Muchos de éstos no provocan daños a las plantas en campo, sin embargo se convierten en patógenos en condiciones *in vitro*, como ocurrió en las semillas de melón. A diferencia de los hongos filamentosos y las levaduras, las bacterias a menudo no producen crecimiento visible sobre el medio o síntomas en la planta, sino hasta mucho tiempo después de que fueron introducidas; en las semillas de *C. melo*, tanto hongos como bacterias se manifestaron hasta los 3 ó 5 días después de que se sembraron en el medio.

George, Sherrington (1984) y Pierik (1990) recomiendan que antes de la esterilización, se debe realizar un lavado con agua, eliminar la capa más externa en este caso las cubiertas de los cotiledones, para facilitar la entrada de las soluciones químicas, razón por la cual se realizó la escarificación

manual en los tratamientos 4 y 5, sin embargo este procedimiento no fue suficiente para obtener una exitosa eliminación de patógenos.

Mere y Vázquez (2003) al igual que George y Sherrington (1984), mencionan que la imbibición en etanol como antiséptico elimina el aire y disuelve la capa epicuticular de las semillas, ejerciendo un efecto en la permeabilidad, desorganizando la posición ordenada de lípidos y proteínas que componen las membranas y alteran la función de éstas, lográndose la inhibición de la actividad de muchos organismos, aún cuando no se eliminan totalmente, por ello, en algunos casos se tiene que recurrir a agentes desinfectantes. En el caso de las semillas trabajadas en este experimento, la imbibición en etanol con duración de 1 a 2 minutos no fue suficiente para desorganizar las capas de lípidos y permitir el contacto del resto de los agentes químicos, por lo que se aumentó la concentración al 50% (v/v) y el tiempo a 4 min.

El hipoclorito de sodio (NaClO_2 al 8% v/v) se utilizó como agente desinfectante y oxidativo ya que actúa sobre proteínas y ácidos nucleicos, eliminando hongos, bacterias y esporas (www.microbiologia.com.ar); al cloro se le adicionó plata coloidal Microdyn[®] (10 gotas en 25 ml de agua), el cual contiene partículas que permanecen suspendidas, que al reaccionar con los grupos SH de las proteínas funcionales y estructurales de las células bacterianas, inhiben la respiración, logrando así matar a las bacterias presentes en la superficie de las semillas (www.mantra.com.ar y www.healthfraud.org). Así mismo se agregó el Tween 20 (agente surfactante), con una concentración de 20 gotas en 250 ml de agua, el cual actuó en la disminución de la tensión superficial, permitiendo la penetración de las otras sustancias desinfectantes, eliminando las ceras de las plantas, (George y Sherrington 1984, Pierik, 1990 y Uribe, 1998).

Varios autores tales George y Sherrington 1984, Pierik, 1990 y Uribe, 1998, recomiendan el uso de estos productos químicos, al igual que ellos, en este trabajo se demostró que gracias a esta combinación, se eliminaron la

mayoría de microorganismos aunque no en su totalidad. Para lograr la asepsia total estos mismos autores recomienda el empleo de bactericidas y fungicidas, en tiempos prolongados. George y Sherrington (1984) emplean desinfectantes útiles en la eliminación de patógenos, elaborados a base de bactericidas, como es el caso de Agri-mycin 500[®], el cual está compuesto por antibióticos como sulfato de estreptomina, clorhidrato de oxitetraciclina y sulfato tribásico de cobre monohidratado, siendo muy importantes para la eliminación de dichas bacterias; en este trabajo se probó en la misma concentración, aunque por diferentes tiempos. Se observó que en el tratamiento 4 disminuyó la presencia de bacterias, por el efecto del Agri-mycin 500[®], aunque siguieron apareciendo, hongos por lo que se recurrió a la exposición a Benlate[®], lográndose, finalmente la eliminación de hongos. El fungicida (Benlate[®]), es sistémico a base de benomil, de amplio espectro, no tóxico para la plantas, útil para la aplicación en semillas, que actúa sobre una gran variedad de hongos, como: *ascomycetos*, *deuteromycetos* y *basidiomycetos*. Es un inhibidor eficaz en la división celular de los hongos; actúa interfiriendo en la síntesis del ADN, la mitosis y el mecanismo de transmisión de mensajes genéticos del ADN al ARN, también actúa sobre los tubos germinativos de las esporas, distorsionándolos e inhibiendo su crecimiento; genera una fina capa protectora que impide la germinación de nuevas esporas (De Liñán, 1997; www.es.wikipedia.org, www.uc.org, www.colinagro.com).

Alvarado (1988) reporta que la esterilización superficial produce la destrucción de organismos saprófitos y esporas superficiales en las capas más externas del material vegetal, pero que no elimina infecciones dentro de los tejidos, los cuales son llamados infecciones sistémicas. También asegura que un gran número de bacterias causan infecciones sistémicas en las plantas, las cuales están presentes entre las células y son difíciles de detectar; que la presencia de estos patógenos pueden dar como resultado un

crecimiento lento y una alteración morfogénica, las cuales se observaron en las semillas de melón.

Aunque no se puede asegurar que las bacterias existentes en las semillas sean sistémicas, su presencia, desarrollo e inhibición de la germinación hacen intuir que pertenecen al grupo de organismos sistémicos, los cuales son reportados también por Pierik en 1990, Herman en 1995 y Alvarado en 1998. Estos microorganismos están asociados a los tejidos de las plantas, muchos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y quedan protegidos de los agentes químicos como lo explican; generalmente no se eliminan con procedimientos de desinfección superficial ya que requieren de medidas adicionales como la incorporación de uno o más antibióticos, ya sea en el proceso de desinfección o en los medios de cultivo, quimioterapia y/o termoterapia.

En este trabajo se recurrió a dos antibióticos, los cuales fueron de gran utilidad en la eliminación de microorganismos bacterianos, entre los antibióticos más empleados se encuentra la amikacina y el claforan.

La amikacina, que pertenece al grupo de los aminoglucósidos, es un antibiótico de amplio espectro, uniéndose a los microorganismos, haciendo que éstos produzcan proteínas anómalas, esenciales para su supervivencia por lo que su alteración es generalmente mortal para ella (www.nlm.nih.gov, www.farmaciasahumada.cl, www.viatusalud.com). Su forma de acción es atravesando la pared bacteriana por difusión, y la membrana plasmática por transporte activo, lo que le permite unirse a la subunidad menor (30S) de los ribosomas bacterianos produciendo errores en la traducción, lo que lleva inevitablemente a la muerte bacteriana. Son ineficaces contra gram-negativos anaerobios (Narayanasamy, 2002, www.cebac.com.ar, www.imss.gob.mx, www.rincondelvago.com). La amikacina puede interaccionar con otros medicamentos, entre los cuales están la cefalosporinas (grupo del claforan).

El segundo antibiótico probado fue elclaforan, el cual pertenece a los antibióticos del grupo de las cefalosporinas, bactericida de amplio espectro, su forma de acción es inhibiendo la biosíntesis de péptidos de la pared celular bacteriana, rompiéndola en pedazos a la célula y causando la muerte de bacterias gram-positivas y gram-negativas (www.micro.magnet.fsu.edu, www.healthtoch.com, www.rxlist.com).

Lo anterior explica cómo fue que actuaron los antibióticos y los agentes químicos, cabe mencionar que es cierto que el éxito de la eliminación de organismos patógenos no fue del 100%, apenas se logró alcanzar el 58% de eficacia.

Ensayo 1. Inducción y proliferación de callos.

El crecimiento celular es un proceso controlado por los reguladores de crecimiento, los cuales juegan un papel importante, no sólo dentro de las plantas como universo, sino también a nivel de órgano, tejido y célula (Esau, 1985), es por ello que los explantes de *C. melo* trabajados en este ensayo, respondieron favorablemente al formar callo, esta producción de células es la manifestación de las interacciones que se establecen entre los medios nutritivos, suplementados con reguladores de crecimiento, con las condiciones fisiológicas y bioquímicas endógenas de los explantes.

Todos los tejidos probados en *C. melo*, indujeron callo, el cual proliferó y logró la formación de brotes; autores como Dirks y Buggenum (1989), Kathal, *et al.* (1988 y 1994), Liborio, *et al.* (2001) y Rhimi, *et al.* (2006), han demostrado que la formación de callo se puede iniciar casi a partir de cualquier órgano vegetal, ya sea hoja, tallo, raíz, nudo, pecíolo, cotiledones, etc. y no sólo la formación de callo, en algunos casos, como lo demostró Liborio, *et al.* y Rhimi, *et al.*, se logra también la regeneración de brotes; es por esto que la respuesta celular a la formación callo depende de muchos factores, como son el origen del tejido, las condiciones fisiológicas y

bioquímicas de los tejidos, la composición de los medios de los cultivos y las condiciones ambientales, entre otras (Álvarez, 1994).

En este ensayo se pudo probar que los tres medios de cultivo, influyeron en la proliferación de callo. Al analizar los resultados, se observa que la respuesta depende en gran medida del tipo de explante que se utilice. En las gráficas correspondientes al ensayo 1 (págs. 43, 44 y 45) se aprecia que los tres medios muestran una producción de callo muy similar, sin embargo al analizar la producción de callo por explantes, se observa que el nudo presenta datos relevantes en cuanto a la producción de callo, más por su composición celular que por la composición de los medios en cuanto a macro y micro elementos, vitaminas y reguladores de crecimiento.

El cultivo de tallos, hojas, entrenudos y nudos de melón, son órganos diferenciados, que permitieron la obtención de callo mediante la dediferenciación de sus células; en contraste con los nudos que presentaron una proliferación continua y acelerada de callo, con apariencia desorganizada, generalmente heterogéneos debido a que las células no requirieron una dediferenciación por contener, este tejido, un gran número de células meristemáticas, las cuales tienen la cualidad de dividirse aceleradamente.

Álvarez (1994), García-Campusano (2003) y Shwarz y Beaty, (2000) han descrito al callo, como estructuras organizadas de 6 o más células, originadas a partir de divisiones periclinales y luego anticlinales de una sola célula inicial. En la Lámina 6.2 (pág 56), pueden ser observadas las células que conforman el callo de nudo de melón cultivadas en medio MS-II, las cuales presentan vacuolas conspicuas, similares a las células del parénquima, presentando diversas formas, como esféricas, ovaladas o alargadas, núcleos grandes y citoplasma denso, paredes muy delgadas entre sí, con pocos o sin espacios intercelulares.

Algunos callos son masas celulares compactas y duras como los cultivados en MS-II y Myt, con células íntimamente unidas, mientras que

otras forman tejidos esponjosos con una gran cantidad de espacios intercelulares como es el caso del medio SH, esta observaciones son también reportadas por Álvarez, 1994 y Bonilla, 1999.

Los callos de *C. melo* se identificaron y clasificaron por su consistencia, capacidad regenerativa y algo muy distintivo, por su color, variando este desde el verde muy brillante, hasta el color amarillo-verdoso o solo amarillo que manifestaba su oxidación. Álvarez (1994) señala que la coloración del tejido de callo varía, aun derivando de la misma especie, se pueden presentar callos que carecen de pigmentación, mientras otros pueden ser de diferentes tonos de verde, amarillo, café o rojo. El tipo y grado de pigmentación está influenciado por factores nutricionales y ambientales y se manifiesta por la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas.

En este trabajo se observó que la desdiferenciación y la rediferenciación de las células de los explantes tiene mucho que ver con la composición anatómica de éstos, por lo que, la composición celular de cada explante fue tomada en cuenta, principalmente a nivel meristemático. Por lo general, los meristemas se caracterizan por presentar células pequeñas, esencialmente isodiamétricas con membranas delgadas, sin una clara vacuolización, grueso núcleo central con nucleolo frecuentemente voluminoso y mitocondrias numerosas todo esto reportado por Esau (1985), Mauseth (1988) y Margara (1988)

Las plantas poseen variedad de meristemas como son: primarios, cambium, intercalares, foliares o marginales, todos contribuyendo a la construcción de la arquitectura de la planta, tal como lo reporta Margara en 1988. En el caso de *C. melo*, se observó que los cuatro explantes utilizados tienen la capacidad de formar callo, debido a que poseen zonas meristemáticas capaces de diferenciarse; las zonas meristemáticas de cada órgano se muestran en la siguiente Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Explantes con sus respectivas manifestaciones meristemáticas reportados por Margara, 1988; Esau, 1985; Mauseth, 1988 y Alberts, *et al.*, 1996.

<i>Explante</i>	<i>Tipo de meristemo, funcionamiento</i>
Hoja	Meristemo foliar. Funcionamiento simultaneo o secuencial, permite la morfogénesis de la hoja. Funcionamiento limitado en tiempo y cesa cuando la hoja ha alcanzado su forma y dimensiones definidas.
Pecíolo	Meristemos marginales y meristemos intercalares
Entrenudo	Meristemos marginales, meristemos intercalares, meristemos de engrosamiento primario, meristemos de elongación.
Nudo	Meristemos apicales-axiales. Respuesta del continuo crecimiento y desarrollo, su función es indefinida produciendo módulos, cuyo número no para de aumentar. Su desarrollo culmina con la formación de estructuras como la hoja o una flor.

Como se observa en la Tabla 7.1, los cuatro explantes empleados en el ensayo 1 presentan células meristemáticas; sin embargo algunos de ellos contienen meristemos importantes únicamente para la formación de órganos como es el caso de la hoja y el pecíolo, que al llegar a su completa diferenciación termina su actividad, en el entrenudo la actividad de los meristemos es muy larga, ya que tiene el trabajo de engrosamiento y elongación de la planta y por último el nudo, el cual presenta los meristemos llamados apicales-axiales en constante actividad, que puede llegar a ser ilimitada ya que son las encargadas del crecimiento continuo y el desarrollo de la planta, no sólo está limitado a formar órganos o a dar elongación o engrosamiento, también tiene el trabajo de la formación de módulos de la planta.

En el caso de la formación de callo de melón, fue la anatomía presentada en el nudo la que marcó la diferencia, tal anatomía puede observarse en la Lámina 6.1 (pág. 55), donde las células que la conforman son las típicas células meristemática, se aprecia, que en el ápice del brote, se encuentra una cúpula central, pequeña y baja, rodeada por un conjunto de protuberancias; la cúpula central es el meristemo apical axial, rodeado de los

primordios foliares. Esta región, contiene los rudimentos ya diferenciados de varios módulos completos. Mediante un programa muy preciso de proliferación celular y expansión celular, cada primordio foliar y sus células adyacentes crecen formando una hoja, un nudo y un entrenudo. Mientras, el meristemo apical da lugar a un nuevo primordio foliar, generando cada vez más módulos, en una sucesión potencialmente infinita como lo describe Alberts, *et al.* (1996), Esau (1985) y Mauseth (1988). Así mismo, el nudo, aún cuando es un tejido diferenciado, conserva la potencialidad de diferenciarse y dar origen a diversas estructuras (www.omega.ilce.edu.mx).

George y Sherrington (1984), Mauseth (1988), Bonilla (1999) y Alberts, *et al.* (1996), reportan que en general, los callos derivados de plántulas y meristemos apicales-axiales tienen un mayor potencial para la morfogénesis, además de tener un crecimiento más vigoroso que los callos provenientes de otros explantes. En estos meristemos, tienen lugar divisiones celulares rápidas y continuas, produciendo aproximadamente 5×10^5 células cada día. Los meristemos apicales-axiales pueden regenerar plantas completas más rápidamente que los tejidos de otras fuentes, las plantas regeneradas usualmente retienen las mismas características genéticas de los progenitores, lo que se debe a la naturaleza diploide de las células meristemáticas, lo que sustenta el mayor éxito en la proliferación de callo de *Cucumis melo* L.

No se pueden tomar en cuenta de forma aislada, factores que influyen en la formación de callo como son los micro y macro elementos del medio de cultivo, las vitaminas, los reguladores de crecimiento, las condiciones de cultivo, los explantes involucrados, etc., todos los elementos interactúan, para modular la expresión genética, es por ello que la respuesta morfogenética no recae en un solo factor, sino que es el resultado de interacciones, aún cuando uno de ellos tenga mayor efecto.

Otro factor importante para la inducción y proliferación de los callos además de la anatomía, son los medios de cultivo, los cuales fueron

importantes para su formación; Margara (1988) comenta que la nutrición mineral *in vitro* depende, de elementos proporcionados por el explante que pueden ser reguladores de crecimiento endógenos y a la vez de los aportados en la solución nutritiva. Algunas masas de tejidos pueden brotar en medios principalmente ricos en N como es el caso del medio MS-II, el cual tiene como base las sales del medio MS, el cual ha demostrado una acción estimulante sobre la organogénesis (formación de yemas). El medio MS está caracterizado por un contenido fuerte de nitrógeno (60 meq/l) del cual $\frac{1}{3}$ está aportado en forma reducida (NH_4^+) y por una concentración igualmente elevada en potasio.

Aunque es cierto que los tres medios de cultivo tuvieron éxito en la producción de callo de forma muy similar, es importante reconocer que el medio SH mostró un elevado porcentaje de oxidación en el callo producido tal como lo muestra la Gráfica 6.4 (pág 46)., lo cual se le adjudica a la alta concentración de 2,4-D (6 mg l^{-1}) empleada, ya que Álvarez en 1994 reportó que esta auxina tiene un efecto oxidativo sobre el callo debido a que provoca altas tasas metabólicas, ocasionando que las células de callo proliferen mucho más rápido, suprimiendo la morfogénesis; estas altas tasas de división celular, provocan elevación en las respiración, mayor envejecimiento y por tanto una mayor oxidación celular; a este respecto también, Villaviscencio en 2002, argumenta que el 2,4-D, es una auxina muy fuerte que se hace tóxica en concentraciones muy elevada y que provoca la reacción hiperhídrica de los tejidos, siendo iniciador o inductor de la división celular.

Ensayo 2. Inducción, proliferación y cinética de crecimiento de callos.

Razdan (2003), Liborio (2000) y Villaviscencio (2002), reportan la utilización de callos para estudios de modelos biológicos, por lo que el crecimiento del callo organogénico de melón, puede ser evaluado, a partir de mediciones de peso fresco como en este caso.

La cinética de crecimiento del cultivo de callo de *C. melo* L. se asemeja a una curva sigmoideal, que presenta una línea recta con una tendencia totalmente ascendente, presentando dos fases: la exponencial o lineal, donde la tasa de crecimiento muestra una aceleración constante, como lo reportó Razdan en el 2003. Una vez que la división celular ha sido inducida, la fase exponencial se presenta rápidamente, elevando el número de células de callo debido a un proceso mitótico aumentando la actividad respiratoria, medida a través del consumo de O₂ y niveles de ARN, como lo mencionan Lindsey y Jones, en 1989.

En la llamada fase *lag* o de reposo, reportada por George y Sherrington (1984), el inóculo no presenta ninguna señal de división celular, donde únicamente se está adaptando a las nuevas condiciones de nutrición, no se observa en la cinética de crecimiento de *C. melo* L., debido a que el callo no presenta dificultad para adaptarse al medio donde se cultivó.

La actividad fisiológica de las plantas está mediada por reguladores de crecimiento, que ejercen efectos en el desarrollo y diferenciación. La totipotencia celular hace posible que los tejidos vegetales cultivados *in vitro* tengan la capacidad para formar callo, diferenciarse en meristemas adventicios y regenerar nuevos órganos, como ocurrió con el melón. Segura (2000) argumente que aunque la organogénesis es el resultado de una interacción entre el material vegetal, el medio de cultivo y las condiciones ambientales, y los reguladores de crecimiento como auxinas y citocininas, desempeñan un papel fundamental.

La relación auxina–citocinina *in vitro* es indispensable para la división celular y la morfogénesis de meristemas tanto apicales como de raíces, por lo que la investigación se centró en encontrar la concentración óptima, tanto de la auxina como de la citocinina, tomando en cuenta las variaciones de respuesta interespecífica que presentan, las interacciones entre los reguladores de crecimiento son la base para explicar procesos fisiológicos, entre los que se incluye la regulación de la división celular. Para *C. melo* L.

se encontró que tanto el medio MS-II y Myt presentaron la formación de callo y brotes, la diferencia entre los dos medio se centra en los diferentes reguladores de crecimiento que los suplementa y las concentraciones a las que se encuentran como reporta Segura (2000), www.ilustrados.com, www.koning.ecsu.ctstateu.edu y www.plantphys.info.

El crecimiento y la morfogénesis *in vitro* está regulada por las interacciones y el balance entre los reguladores de crecimiento que suplementan al medio de cultivo, además de las sustancias de crecimiento producidas endógenamente por las células cultivadas.

La inducción de callo con altas tasas de crecimiento y un número elevado en la formación de brotes presentadas en el medio MS-II, se logró gracias a la combinación de auxina-citocinina empleada, 1.5 mg l^{-1} de AIA y 6 mg l^{-1} de Cin, aunque el medio Myt presentó un comportamiento parecido con 3 mg l^{-1} de 2,4-D y 0.3 mg l^{-1} de BAP, las tasas de crecimiento y el número de brotes, fueron menores. En el caso de MS-II la curva de crecimiento muestra mayor incremento en el peso de callo comparado con Myt, debido a que MS-II presenta una alta actividad mitótica, como lo demuestran las pruebas de T, ANDEVA y Tukey.

En las plantas dicotiledóneas, como es el caso del melón, la proliferación de callo requiere la presencia de auxinas y citocininas en el medio de cultivo. Una baja concentración de auxinas conjugada con una elevada concentración de citocinina estimula la proliferación de brotes como fue el caso del medio de cultivo MS-II, como se confirma con los trabajos de Segura (2000), Herman (1994 y 1995), Pierik (1990), Álvarez (1994) y George y Sherrington (1984).

Acosta, *et al.* en el 2000, reportan que las auxinas, como el AIA empleada en MS-II y el BAP en Myt se encuentran en el citoplasma de las células en forma de anión, actúan de modo diverso en el crecimiento por alargamiento celular, incrementando el contenido osmótico de la célula y la permeabilidad al agua que es transportada a las vacuolas, vesículas del

retículo endoplásmico o al aparato de Golgi, así como a organelos como los cloroplastos por medio de proteínas transportadoras, aumentan la síntesis de ARN, originando proteínas específicas que provocan el aumento de la plasticidad de la pared celular, trae como consecuencia su extensión y con ello un incremento por alargamiento, lo que explica como actuaron las auxinas en las células de callo de melón.

Álvarez (1994) y George y Sherrington (1984) argumentan que el 2,4-D es usado en altas concentraciones para la iniciación de la formación de callo, debido a que suprimen la morfogénesis y da por resultado la rápida proliferación del mismo, por la actividad del sistema de cascada de señales, el exceso de auxinas puede suprimir esta división y el crecimiento celular, es por ello que el medio Myt que contenía 2,4-D tuvo una exitosa inducción de callo, pero una baja proliferación de brotes, casi la mitad que la que produjo MS-II.

Para que pueda tener lugar la división celular debe de ocurrir la síntesis de ADN, la mitosis y la citocinesis en las cuales la presencia de citocinina en altas concentraciones es necesaria para que ocurran según reportado por Álvarez en 1994; altas tasas de división celular como ocurrió en *C. melo* L., por tanto se evidencian por medio de valores numéricos en la cinética de crecimiento y por las pruebas estadísticas aplicadas que el medio óptimo para la inducción y proliferación de callo de melón es en el medio MS-II.

Álvarez en 1994, comenta que la inducción *in vitro* de órganos se da en presencia de citocininas como la Cinetina, ya que este regulador de crecimiento está encaminado a la división celular y formación de yemas, las cuales son obtenidas en una proporción mayor de citocinina que de auxinas, lo que explica porqué el medio MS-II formó más brotes que Myt. Este medio contenía en su composición una alta concentración de Cin, mucho más que la cinetina presente en el medio Myt, aún cuando esta citosina empleada (BAP) es una citocinina fuerte.

El contacto de las células de callo con una auxina, estimula la formación de haces vasculares por un proceso de diferenciación como lo reportaron Acosta, *et. al.* en el 2000, las imágenes de la Lámina 6.4 (pág. 58) presentan la formación de dichos haces vasculares.

Al utilizar reguladores, como es el caso de MS-II y Myt, el callo se habitúa al medio, es un fenómeno por el cual, los cultivos *in vitro* que inicialmente necesitaban reguladores para su crecimiento y formación de órganos, después de algunos subcultivos, necesitan menor aportación de reguladores o prescindir de ellos (medio MS), que fue el caso del callo de melón, estimulando un cambio en la actividad genética, impulsando la formación de brotes como lo explican Pierik (1990) y George y Sherington (1984).

Regeneración y enraizamiento.

La proliferación más notable de callo de melón se localiza en zonas meristemáticas de los nudos. La formación de estas secciones proliferantes se da gracias a que conforme la tasa de división desciende, el plano de división del tejido se altera dando inicio a la actividad meristemática y así inicia la formación de nódulos que darán origen a brotes confirmado por Razdan (2003), Villaviscencio (2002) y Margara (1988).

Se han formulado diversos medios de cultivo para la inducción de brotes, los cuales varían en las concentraciones de sales minerales, especialmente en la fuente de nitrógeno, así mismo se ha demostrado que las concentraciones de los minerales afectan también la capacidad morfogenética del explante. Otros factores que deben tenerse en cuenta son componentes orgánicos, fuente de carbono, la morfología de las estructuras y condiciones de incubación, ejemplo de ello son los trabajos de Kathal, *et al.*, 1988; Niedz, *et al.*, 1989; Dirks y Buggenum, 1989; Tabei, *et al.*, 1991; Shetty, *et al.*, 1992; Kathal, *et al.*, 1994; Leshem, *et al.*, 1994; Leshem, *et al.*, 1995; Singh, *et al.*, 1996; Ezura, *et al.*, 1997; Liborio, *et al.*, 2001;

Papadopoulou y Grumet, 2002 y Rhimi, *et al.*, 2006, todos ellos obtuvieron la formación de brotes, en bajo porcentaje, ninguno logrando el desarrollo de sus brotes (Liborio, *et al.*, 2001). Sin embargo, en este trabajo se logró la obtención de brotes y el desarrollo de éstos hasta llegar a ser plántulas.

En esta última fase se obtuvieron los resultados de la cantidad total de brotes obtenidos en los MS-II y Myt, donde se corroboró estadísticamente que el medio MS-II, debido a la relación auxina-citocinina ya antes discutida, muestra mayor cantidad de formación de brotes. En esta fase, la obtención de brotes se llevó a cabo en ausencia de reguladores de crecimiento exógenos tal como lo reportó García-Campusano en el 2003. La regeneración se obtuvo en el medio MS, donde los macro y microelementos del medio fueron suficientes para lograr el desarrollo de los brotes, sin necesidad de reguladores de crecimiento.

En la Lámina 6.3 (pág. 57) se presenta una fotografía de la yema apical, la cual muestra una estructura típica conformada por el meristemo apical y los primordios foliares.

Al igual que García-Campusano en el 2003, con las observaciones realizadas en esta investigación, se pudo probar que la formación de brotes (Lámina 6.3, pág. 57) y raíces (Lámina 6.5, pág. 59) durante el cultivo *in vitro*, son procesos en los que intervienen factores tanto intrínsecos, como extrínsecos, estableciéndose, por tanto, interacciones entre eventos bioquímicos, biofísicos y fisiológicos, siendo éstos modulados por los reguladores de crecimiento, a los que fueron expuestos los nudos durante el cultivo.

Para que los brotes tuvieran un buen crecimiento y una posibilidad de tener un desarrollo en suelo, se buscó la formación de raíces. Esta formación se logró gracias al medio MS-III, el cual tuvo la particularidad de haberse suplementado con la auxina AIA. Acosta, *et al.* (2000), Álvarez (1994) y www.euita.upv.es, reportan que la inducción de raíces es un proceso complejo que consta de dos etapas: la formación de primordios de raíz a

partir de ciertas células susceptibles y el crecimiento de éstas lo que es constatando por el análisis histológico realizado, donde en los cortes se aprecia los primordios de raíz y en las fotografías raíces ya desarrolladas. Ambas etapas requieren auxina, aunque las necesidades de cada una son diferentes y dependen de la especie, para *C. melo* L., la concentración requerida en el desarrollo de raíces fue de 2 mg l⁻¹.

Las auxinas influyeron en la expansión celular, en la acidificación de la pared celular, en el inicio de la mitosis (al inducir la replicación de ADN) y en la organización de los meristemos, para dar lugar ya sea a tejido desorganizado (callo) o a órganos definidos, como brotes y raíces además, promueve la diferenciación vascular tal como lo reporta García-Campusano (2003). El AIA en especial, es un factor esencial en la promoción del crecimiento de primordios radiculares, por lo que se puede entender el efecto que tuvo esta auxina en la formación de callo, y de raíces de *C. melo* L.

8. CONCLUSIONES

- La desinfección de semillas de *C. melo* L. var. *inodorus* Naudi tipo honey dew, se logró en presencia de hipoclorito de sodio al 8%, durante 25 min, con Benlate[®], como fungicida [2 g l⁻¹] durante 20 min. y Agri-mycin 500[®] como bactericida [1 g l⁻¹] durante 25 min. La germinación se culminó en medio MS suplementando con Claforan [0.5 mg l⁻¹] como antibiótico.
- La inducción de callos se obtuvo de forma exitosa en el medio nutritivos MS-II y Myt
- Los explantes de nudo, mostraron desdiferenciación a callo muy acentuada, acompañado de una capacidad regenerativa alta, debido a la presencia de meristemos apicales-axiales en su composición celular, por lo que el proceso de formación de callo es más rápido.
- En la cinética de crecimiento la inducción de callos se obtuvo más rápido en el medio MS-II que en Myt, debido a la presencia de altas concentraciones de Cin y AIA, lo que origina una aceleración en la inducción de callo y es evidente en el desarrollo de brotes.
- La organogénesis indirecta se vio beneficiada por el medio MS-II ya que este dio más por explante, que el medio Myt.
- El proceso de enraizamiento se logró en el medio MS-III, ya que el AIA, indujo la formación de raíces.
- Con el trabajo histológico, se pudo comprobar la organogénesis indirecta que dio origen a meristemos, primordios foliares, la formación de un sistema vascular, y un sistema radicular, sin olvidar la posibilidad de que este trabajo sea también exitoso en la formación de embriones somáticos.

- Se logró la regeneración de plantas de melón, si bien el patrón de desarrollo de los brotes adventicios en los diferentes sistemas de cultivo *in vitro* parecen ser similares, esta investigación a un nivel histológico resultó de gran utilidad ya que permitió comprender mejor el proceso organogénico.
- Con este trabajo se logró obtener un protocolo eficiente para la obtención de plántulas de *Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naudi tipo honey dew.
- Gracias a esta investigación se logró caracterizar el cultivo *in vitro* de melón y proporcionar las bases para realizar más estudios y utilizarlo como un modelo biológico.

ANEXO

Cultivo *in vitro* de *Cucumis melo* L.

Tabla 1. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

Medio Sustancias	MS g.l ⁻¹	MS-I g.l ⁻¹	MS-II g.l ⁻¹	MS-III g.l ⁻¹	MyT g.l ⁻¹	SH g.l ⁻¹
Sales del medio	100%	50%	100%	100%	100%	100%
Cóctel 20	—	—	SI	—	SI	—
Vitaminas R ₂	SI	SI	—	SI	—	—
Vitamina Nitch	—	—	—	—	—	SI
Glicina	SI	SI	—	SI	—	—
Adenina	—	—	—	—	SI	—
Antioxidante Ac. ascorbico + Ac. cítrico	1:1	1:1	1:1	1 : 1	2.5:2.5	3.5:3.5
Cinetina	—	—	0.060	—	—	—
BAP	—	—	—	—	0.003	0.002
AIA	—	—	0.015	0.020	—	—
2,4 – D	—	—	—	—	0.030	0.060
Sacarosa	30	30	30	30	50	20
Gellrite®	2.5	2.5	2.5	3	2.5	2.5
pH	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	6

Todas las soluciones trabajadas en mililitros se encuentran con soluciones concentradas 100 X.

**Tabla 2. SALES DEL MEDIO DE CULTIVO CONOCIDO COMO MS (Murashigue & Skoog 1962)
SOLUCIONES DE MACRO Y MICROELEMENTOS, CONCENTRADAS 100X PARA PREPARAR**

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	I I (g)	P.M (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO EN	
				MASA (mg)	MOLES (mM)
SOLUCIÓN I: NITRATOS					
Nitrato de Potasio	KNO ₃	190	101.108	1900	18.792
Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	165	80.04	1650	20.615
SOLUCIÓN II: SULFATOS					
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	37	246.498	370	1.501
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .H ₂ O	1.69	169.01	16.9	0.0999
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.860	287.54	8.6	0.0299
Sulfato de cobre*	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0025	249.68	25 X10 ⁻³	0.1 X10 ⁻³
SOLUCIÓN III: HALÓGENOS					
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	44.0	147.02	440	2.993
Yoduro de potasio	KI	0.083	166.01	0.83	4.999
Cloruro de cobalto*	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0025	237.93	25 X10 ⁻³	0.105 X10 ⁻³
SOLUCIÓN IV: FOSFATO, AC. BÓRICO, MOLIBDATO					
Fosfato de Potasio monobásico	KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	17.0	136.09	170	1.249
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0.620	61.86	6.2	0.1002
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.025	241.95	250 X10 ⁻³	1.03 X10 ⁻³
SOLUCIÓN V: QUELANTES					
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	2.784	278.028	27.8	0.0999
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₁₀ Na ₂ .2H ₂ O	3.724	372.30	37.3	0.1002

**Tabla 3. SALES DEL MEDIO DE CULTIVO CONOCIDO COMO SH (Shenk & Hildebrandt 1972)
SOLUCIONES DE MACRO Y MICROELEMENTOS, CONCENTRADAS 100X PARA PREPARAR**

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	l (g)	P.M (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO EN	
				MASA (mg)	MOLES (mM)
SOLUCIÓN A: NITRATOS					
Nitrato de Potasio	KNO ₃	250	101.108	2500	24.72
Fosfato de Amonio	NH ₄ H ₂ PO ₄	30	115.0	300	2.609
SOLUCIÓN B: SULFATOS					
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	40	246.498	400	1.623
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .H ₂ O	1	169.01	10	0.059
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1	287.54	1.0	3.48x10 ⁻³
Sulfato de cobre* ¹	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.02	249.68	0.2	8.01 x10 ⁻⁴
SOLUCIÓN C: HALÓGENOS					
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	20	147.02	200	1.3603
Yoduro de potasio	KI	0.01	166.01	1.0	6.024 x10 ⁻³
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.01	237.93	0.1	4.203 x10 ⁻⁴
SOLUCIÓN D: AC. BÓRICO, MOLIBDATO					
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0.50	61.83	5.0	0.081
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.01	241.95	0.1	4.133 x10 ⁻³
SOLUCIÓN E: QUELANTES					
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	2	278.028	15	0.054
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₁₀ Na ₂ .2H ₂ O	1.5	372.30	20	0.054

Tabla 4. COMPUESTOS ORGÁNICOS. CONCENTRACIÓN DE SOLUCIONES CONCENTRADAS DE FITOHORMONAS, GLICINA, ADENINA Y ANTIOXIDANTES

NOMBRE DEL COMPUESTO	ABREVIATURA	FORMULA	P.M.(g)	CONCENTRACIÓN	
COMPUESTOS ORGÁNICOS					
para preparar 100 ml					
Auxinas			µM	mg	
Ácido 2,4-d.iclorofenoxiacético	2,4-D	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221	2.21	10
Ácido indol-3-acético	AIA	C ₁₀ H ₉ NO ₂	175.2	1.75	10
Cinetinas					
6-Bencilaminopurina	BAP	C ₁₂ H ₁₁ N ₅	225.3	2.25	10
Cinetina (6-Furfurilaminopurina)	Cin	C ₁₀ H ₉ N ₅ O	215.2	2.15	10
Giberelinas					
Ácido giberélico	AG ₃	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	346.4	3.46	10
OTROS COMPUESTOS ORGÁNICOS					
Concentraciones utilizadas					
(6-aminopurina) Hemisulfato	Adenina	C ₅ H ₅ N ₆ 1/2H ₂ SO ₄	184.2	10	100
Acido aminoacético	Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	2.0	20
ANTIOXIDANTES					
L-Acido ascórbico	Vitamina C	C ₆ H ₈ O ₆	176.1	5.0	50
Acido cítrico		H ₃ C ₆ H ₅ O ₇ H ₂ O	210.146	5.0	50

Tabla 5. SOLUCIONES CONCENTRADAS (100X) DEL CÓCTEL DE VITAMINAS CONOCIDO COMO:

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO		100 ml (g)
			MASA (mg)	MOLES (mM)	
Vitaminas R₂ (MS modificado)					
Myoinositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.2	100	0.555	1
Ac. Nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	123.1	0.5	4.062 μM	0.01
Piridoxina hidrocloreto	C ₈ H ₁₁ NO ₃ · HCl	205.6	0.5	2.432 μM	0.01
Tiamina hidrocloreto	C ₈ H ₁₇ N ₄ OSCl · HCl	337.3	1	2.965 μM	0.02
Vitaminas SH					
Myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.20	1000	5.55	10
Tiamina-HCl	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OSCI * HCl	337.30	5.0	0.015	0.05
Ác. Nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	123.10	5.0	0.041	0.05
Piridoxina-HCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃ * HCl	205.60	0.5	2.43μM	0.005
Vitaminas Cócktel 20 (mezcla de aminoácidos, patente en trámite)					

Tabla 6. SOLUCIONES PARA AJUSTAR PH

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO		100 ml (g)
			MASA (mg)	MOLES (mM)	
Soluciones para ajustar el pH del medio					
Hidróxido de sodio	Na OH	40	1 N= 40 g.L ⁻¹	1 M= 40 g.L ⁻¹	4.0 g
Ácido clorhídrico	HCl	36.46	1N= 83.5 g.L ⁻¹	1M = 36.46 g.L ⁻¹	8.35 ml

Tabla 7. FUENTE DE CARBONO

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO (g)
Sacarosa comercial	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.31	30 ó 50

Análisis Histológico

Tabla 8. PREPARACIÓN DEL FIJADOR FAA

FAA (FORMOL, ÁCIDO ACÉTICO, ALCOHOL ETÍLICO)	
Cantidades para 1 l (ml)	
Formaldehído	100
Alcohol etílico	500
Ac. acético glacial	50
Agua destilada	350

Tabla 9. TREN DE DESHIDRATACIÓN PREPARACIÓN DE ALCOHOLES GRADUALES A PARTIR DEL ALCOHOL ETÍLICO AL 96%.

ALCOHOLES GRADUALES	
Cantidades para preparar 1 l	
Alcohol 85%	88.5 ml de alcohol 96% + 11.5 ml de dH ₂ O
Alcohol 70%	73.0 ml de alcohol 96% + 27.0 ml de dH ₂ O
Alcohol 50%	52.1 ml de alcohol 96% + 47.9 ml de dH ₂ O
Alcohol 30%	31.2 ml de alcohol 96% + 68.8 ml de dH ₂ O

Soluciones utilizadas en el tren de tinción safranina - verde rápido (metilcelosolve)

Tablas 10 y 11. COLORANTES

SAFRANINA EN METILCELOSOLVE	
Para 300 ml	
Safranina O	4 g
Metilcelosolve	200 ml
Alcohol 96%	100 ml
Agua destilada	5 ml
Acetato de sodio	4 g
Formol	8 ml

VERDE RÁPIDO EN METILCELOSOLVE	
Para 100 ml	
Verde rápido	0.5 g
Alcohol absoluto	33.3 ml
Metilcelosolve	33.3 ml
Aceite de clavo	33.3 ml

Tablas 12, 13 y 14. MEZCLAS DE ETANOL

ALCOHOL 96% - ÁCIDO PÍCRICO	
Para 100 ml	
Alcohol 96%	95 ml
Solución saturada de ácido pícrico	5 ml

ACEITE DE CLAVO – XILOL – ETANOL ABSOLUTO	
Para 100 ml	
Aceite de clavo	50 ml
Alcohol absoluto	25 ml
Xilol	25 ml

ALCOHOL 96% - AMONIACO	
Para 100 ml	
Alcohol 96%	100 ml
Amoníaco	4 – 5 gotas

Análisis estadístico

Tabla 15. PRUEBA DE T PARA MUESTRAS DEPENDIENTES.

Se marcan las diferencias significativas con $p < .05000$								
	Media	Desviación Estándar	N	Dif.	Dif. de D.E.	T	g.l.	p
MS_II_1	1	0						
MYT_1	1	0	10	0			9	
MS_II_1	1	0						
MYT_3	1.11	0.024	10	-0.11	0.024	-14.471	9	2E-07
MS_II_1	1	0						
MYT_5	1.166	0.028	10	-0.166	0.028	-19.042	9	1E-08
MS_II_1	1	0						
MYT_7	1.242	0.049	10	-0.242	0.049	-15.636	9	8E-08
MS_II_1	1	0						
MYT_9	1.291	0.056	10	-0.291	0.056	-16.472	9	5E-08
MS_II_1	1	0						
MYT_11	1.4	0.095	10	-0.4	0.095	-13.268	9	3E-07
MS_II_1	1	0						
MYT_13	1.582	0.086	10	-0.582	0.086	-21.369	9	5E-09
MS_II_1	1	0						
MYT_15	1.794	0.069	10	-0.794	0.069	-36.65	9	4E-11
MS_II_1	1	0						
MYT_17	1.993	0.07	10	-0.993	0.07	-44.905	9	7E-12
MS_II_1	1	0						
MYT_19	2.186	0.115	10	-1.186	0.115	-32.475	9	1E-10
MS_II_1	1	0						
MYT_21	2.363	0.158	10	-1.363	0.158	-27.235	9	6E-10
MS_II_1	1	0						
MYT_23	2.431	0.124	10	-1.431	0.124	-36.586	9	4E-11
MS_II_1	1	0						
MYT_25	2.511	0.107	10	-1.511	0.107	-44.776	9	7E-12
MS_II_1	1	0						
MYT_27	2.605	0.161	10	-1.605	0.161	-31.473	9	2E-10
MS_II_3	1.028	0.012						
MYT_1	1	0	10	0.028	0.012	7.2029	9	5E-05
MS_II_3	1.028	0.012						
MYT_3	1.11	0.024	10	-0.082	0.027	-9.6047	9	5E-06
MS_II_3	1.028	0.012						

MYT_5	1.166	0.028	10	-0.138	0.03	-14.674	9	1E-07
MS_II_3	1.028	0.012						
MYT_7	1.242	0.049	10	-0.214	0.051	-13.375	9	3E-07
MS_II_3	1.028	0.012						
MYT_9	1.291	0.056	10	-0.263	0.057	-14.5	9	2E-07
MS_II_3	1.028	0.012						
MYT_11	1.4	0.095	10	-0.372	0.096	-12.267	9	6E-07
MS_II_3	1.028	0.012						
MYT_13	1.582	0.086	10	-0.554	0.09	-19.42	9	1E-08
MS_II_3	1.028	0.012						
MYT_15	1.794	0.069	10	-0.766	0.079	-30.808	9	2E-10
MS_II_3	1.028	0.012						
MYT_17	1.993	0.07	10	-0.965	0.082	-37.421	9	3E-11
MS_II_3	1.028	0.012						
MYT_19	2.186	0.115	10	-1.158	0.126	-28.974	9	3E-10
MS_II_3	1.028	0.012						
MYT_21	2.363	0.158	10	-1.335	0.168	-25.058	9	1E-09
MS_II_3	1.028	0.012						
MYT_23	2.431	0.124	10	-1.403	0.134	-33.007	9	1E-10
MS_II_3	1.028	0.012						
MYT_25	2.511	0.107	10	-1.483	0.117	-40.081	9	2E-11
MS_II_3	1.028	0.012						
MYT_27	2.605	0.161	10	-1.577	0.171	-29.205	9	3E-10
MS_II_5	1.291	0.078						
MYT_1	1	0	10	0.291	0.078	11.87	9	8E-07
MS_II_5	1.291	0.078						
MYT_3	1.11	0.024	10	0.181	0.07	8.2339	9	2E-05
MS_II_5	1.291	0.078						
MYT_5	1.166	0.028	10	0.125	0.062	6.4265	9	1E-04
MS_II_5	1.291	0.078						
MYT_7	1.242	0.049	10	0.049	0.057	2.7349	9	0.023
MS_II_5	1.291	0.078						
MYT_9	1.291	0.056	10	-3E-18	0.071	-1E-16	9	1
MS_II_5	1.291	0.078						
MYT_11	1.4	0.095	10	-0.109	0.12	-2.8758	9	0.018
MS_II_5	1.291	0.078						
MYT_13	1.582	0.086	10	-0.291	0.107	-8.6233	9	1E-05
MS_II_5	1.291	0.078						
MYT_15	1.794	0.069	10	-0.503	0.102	-15.664	9	8E-08
MS_II_5	1.291	0.078						
MYT_17	1.993	0.07	10	-0.702	0.118	-18.75	9	2E-08
MS_II_5	1.291	0.078						

MYT_19	2.186	0.115	10	-0.895	0.152	-18.606	9	2E-08
MS_II_5	1.291	0.078						
MYT_21	2.363	0.158	10	-1.072	0.206	-16.451	9	5E-08
MS_II_5	1.291	0.078						
MYT_23	2.431	0.124	10	-1.14	0.172	-20.961	9	6E-09
MS_II_5	1.291	0.078						
MYT_25	2.511	0.107	10	-1.22	0.147	-26.25	9	8E-10
MS_II_5	1.291	0.078						
MYT_27	2.605	0.161	10	-1.314	0.198	-21.034	9	6E-09
MS_II_7	1.556	0.15						
MYT_1	1	0	10	0.556	0.15	11.729	9	9E-07
MS_II_7	1.556	0.15						
MYT_3	1.11	0.024	10	0.446	0.14	10.079	9	3E-06
MS_II_7	1.556	0.15						
MYT_5	1.166	0.028	10	0.39	0.132	9.3735	9	6E-06
MS_II_7	1.556	0.15						
MYT_7	1.242	0.049	10	0.314	0.12	8.2479	9	2E-05
MS_II_7	1.556	0.15						
MYT_9	1.291	0.056	10	0.265	0.132	6.36	9	1E-04
MS_II_7	1.556	0.15						
MYT_11	1.4	0.095	10	0.156	0.174	2.8333	9	0.02
MS_II_7	1.556	0.15						
MYT_13	1.582	0.086	10	-0.026	0.159	-0.517	9	0.618
MS_II_7	1.556	0.15						
MYT_15	1.794	0.069	10	-0.238	0.159	-4.7457	9	0.001
MS_II_7	1.556	0.15						
MYT_17	1.993	0.07	10	-0.437	0.179	-7.7331	9	3E-05
MS_II_7	1.556	0.15						
MYT_19	2.186	0.115	10	-0.63	0.202	-9.8523	9	4E-06
MS_II_7	1.556	0.15						
MYT_21	2.363	0.158	10	-0.807	0.259	-9.8541	9	4E-06
MS_II_7	1.556	0.15						
MYT_23	2.431	0.124	10	-0.875	0.227	-12.172	9	7E-07
MS_II_7	1.556	0.15						
MYT_25	2.511	0.107	10	-0.955	0.2	-15.07	9	1E-07
MS_II_7	1.556	0.15						
MYT_27	2.605	0.161	10	-1.049	0.244	-13.582	9	3E-07
MS_II_9	1.851	0.21						
MYT_1	1	0	10	0.851	0.21	12.786	9	4E-07
MS_II_9	1.851	0.21						
MYT_3	1.11	0.024	10	0.741	0.2	11.712	9	9E-07
MS_II_9	1.851	0.21						

MYT_5	1.166	0.028	10	0.685	0.194	11.18	9	1E-06
MS_II_9	1.851	0.21						
MYT_7	1.242	0.049	10	0.609	0.184	10.484	9	2E-06
MS_II_9	1.851	0.21						
MYT_9	1.291	0.056	10	0.56	0.196	9.0239	9	8E-06
MS_II_9	1.851	0.21						
MYT_11	1.4	0.095	10	0.451	0.24	5.9442	9	2E-04
MS_II_9	1.851	0.21						
MYT_13	1.582	0.086	10	0.269	0.226	3.768	9	0.004
MS_II_9	1.851	0.21						
MYT_15	1.794	0.069	10	0.057	0.22	0.8204	9	0.433
MS_II_9	1.851	0.21						
MYT_17	1.993	0.07	10	-0.142	0.235	-1.9071	9	0.089
MS_II_9	1.851	0.21						
MYT_19	2.186	0.115	10	-0.335	0.252	-4.1961	9	0.002
MS_II_9	1.851	0.21						
MYT_21	2.363	0.158	10	-0.512	0.309	-5.2452	9	5E-04
MS_II_9	1.851	0.21						
MYT_23	2.431	0.124	10	-0.58	0.282	-6.4927	9	1E-04
MS_II_9	1.851	0.21						
MYT_25	2.511	0.107	10	-0.66	0.256	-8.1557	9	2E-05
MS_II_9	1.851	0.21						
MYT_27	2.605	0.161	10	-0.754	0.302	-7.8856	9	2E-05
MS_II_11	2.14	0.266						
MYT_1	1	0	10	1.14	0.266	13.527	9	3E-07
MS_II_11	2.14	0.266						
MYT_3	1.11	0.024	10	1.03	0.255	12.793	9	4E-07
MS_II_11	2.14	0.266						
MYT_5	1.166	0.028	10	0.974	0.25	12.334	9	6E-07
MS_II_11	2.14	0.266						
MYT_7	1.242	0.049	10	0.898	0.239	11.89	9	8E-07
MS_II_11	2.14	0.266						
MYT_9	1.291	0.056	10	0.849	0.251	10.682	9	2E-06
MS_II_11	2.14	0.266						
MYT_11	1.4	0.095	10	0.74	0.294	7.9591	9	2E-05
MS_II_11	2.14	0.266						
MYT_13	1.582	0.086	10	0.558	0.281	6.2808	9	1E-04
MS_II_11	2.14	0.266						
MYT_15	1.794	0.069	10	0.346	0.274	3.991	9	0.003
MS_II_11	2.14	0.266						
MYT_17	1.993	0.07	10	0.147	0.289	1.6082	9	0.142
MS_II_11	2.14	0.266						

MYT_19	2.186	0.115	10	-0.046	0.304	-0.4778	9	0.644
MS_II_11	2.14	0.266						
MYT_21	2.363	0.158	10	-0.223	0.359	-1.9631	9	0.081
MS_II_11	2.14	0.266						
MYT_23	2.431	0.124	10	-0.291	0.336	-2.7398	9	0.023
MS_II_11	2.14	0.266						
MYT_25	2.511	0.107	10	-0.371	0.312	-3.7637	9	0.004
MS_II_11	2.14	0.266						
MYT_27	2.605	0.161	10	-0.465	0.359	-4.1011	9	0.003
MS_II_13	2.431	0.328						
MYT_1	1	0	10	1.431	0.328	13.779	9	2E-07
MS_II_13	2.431	0.328						
MYT_3	1.11	0.024	10	1.321	0.316	13.211	9	3E-07
MS_II_13	2.431	0.328						
MYT_5	1.166	0.028	10	1.265	0.312	12.814	9	4E-07
MS_II_13	2.431	0.328						
MYT_7	1.242	0.049	10	1.189	0.302	12.47	9	6E-07
MS_II_13	2.431	0.328						
MYT_9	1.291	0.056	10	1.14	0.314	11.479	9	1E-06
MS_II_13	2.431	0.328						
MYT_11	1.4	0.095	10	1.031	0.356	9.1475	9	7E-06
MS_II_13	2.431	0.328						
MYT_13	1.582	0.086	10	0.849	0.344	7.8058	9	3E-05
MS_II_13	2.431	0.328						
MYT_15	1.794	0.069	10	0.637	0.336	6.0006	9	2E-04
MS_II_13	2.431	0.328						
MYT_17	1.993	0.07	10	0.438	0.349	3.967	9	0.003
MS_II_13	2.431	0.328						
MYT_19	2.186	0.115	10	0.245	0.362	2.1394	9	0.061
MS_II_13	2.431	0.328						
MYT_21	2.363	0.158	10	0.068	0.415	0.5177	9	0.617
MS_II_13	2.431	0.328						
MYT_23	2.431	0.124	10	3E-17	0.395	3E-16	9	1
MS_II_13	2.431	0.328						
MYT_25	2.511	0.107	10	-0.08	0.372	-0.6805	9	0.513
MS_II_13	2.431	0.328						
MYT_27	2.605	0.161	10	-0.174	0.419	-1.3131	9	0.222
MS_II_15	2.726	0.391						
MYT_1	1	0	10	1.726	0.391	13.959	9	2E-07
MS_II_15	2.726	0.391						
MYT_3	1.11	0.024	10	1.616	0.379	13.493	9	3E-07
MS_II_15	2.726	0.391						

MYT_5	1.166	0.028	10	1.56	0.375	13.149	9	4E-07
MS_II_15	2.726	0.391						
MYT_7	1.242	0.049	10	1.484	0.365	12.867	9	4E-07
MS_II_15	2.726	0.391						
MYT_9	1.291	0.056	10	1.435	0.377	12.03	9	8E-07
MS_II_15	2.726	0.391						
MYT_11	1.4	0.095	10	1.326	0.419	10	9	4E-06
MS_II_15	2.726	0.391						
MYT_13	1.582	0.086	10	1.144	0.407	8.885	9	9E-06
MS_II_15	2.726	0.391						
MYT_15	1.794	0.069	10	0.932	0.398	7.4069	9	4E-05
MS_II_15	2.726	0.391						
MYT_17	1.993	0.07	10	0.733	0.41	5.6515	9	3E-04
MS_II_15	2.726	0.391						
MYT_19	2.186	0.115	10	0.54	0.421	4.053	9	0.003
MS_II_15	2.726	0.391						
MYT_21	2.363	0.158	10	0.363	0.473	2.4258	9	0.038
MS_II_15	2.726	0.391						
MYT_23	2.431	0.124	10	0.295	0.455	2.0508	9	0.071
MS_II_15	2.726	0.391						
MYT_25	2.511	0.107	10	0.215	0.433	1.5712	9	0.151
MS_II_15	2.726	0.391						
MYT_27	2.605	0.161	10	0.121	0.48	0.7977	9	0.446
MS_II_17	2.981	0.409						
MYT_1	1	0	10	1.981	0.409	15.308	9	9E-08
MS_II_17	2.981	0.409						
MYT_3	1.11	0.024	10	1.871	0.399	14.846	9	1E-07
MS_II_17	2.981	0.409						
MYT_5	1.166	0.028	10	1.815	0.395	14.538	9	1E-07
MS_II_17	2.981	0.409						
MYT_7	1.242	0.049	10	1.739	0.385	14.279	9	2E-07
MS_II_17	2.981	0.409						
MYT_9	1.291	0.056	10	1.69	0.398	13.441	9	3E-07
MS_II_17	2.981	0.409						
MYT_11	1.4	0.095	10	1.581	0.44	11.371	9	1E-06
MS_II_17	2.981	0.409						
MYT_13	1.582	0.086	10	1.399	0.426	10.388	9	3E-06
MS_II_17	2.981	0.409						
MYT_15	1.794	0.069	10	1.187	0.414	9.0637	9	8E-06
MS_II_17	2.981	0.409						
MYT_17	1.993	0.07	10	0.988	0.421	7.4198	9	4E-05
MS_II_17	2.981	0.409						

MYT_19	2.186	0.115	10	0.795	0.433	5.8029	9	3E-04
MS_II_17	2.981	0.409						
MYT_21	2.363	0.158	10	0.618	0.483	4.0485	9	0.003
MS_II_17	2.981	0.409						
MYT_23	2.431	0.124	10	0.55	0.469	3.7092	9	0.005
MS_II_17	2.981	0.409						
MYT_25	2.511	0.107	10	0.47	0.449	3.3111	9	0.009
MS_II_17	2.981	0.409						
MYT_27	2.605	0.161	10	0.376	0.489	2.4323	9	0.038
MS_II_19	3.633	0.839						
MYT_1	1	0	10	2.633	0.839	9.9197	9	4E-06
MS_II_19	3.633	0.839						
MYT_3	1.11	0.024	10	2.523	0.833	9.5741	9	5E-06
MS_II_19	3.633	0.839						
MYT_5	1.166	0.028	10	2.467	0.831	9.3894	9	6E-06
MS_II_19	3.633	0.839						
MYT_7	1.242	0.049	10	2.391	0.817	9.2559	9	7E-06
MS_II_19	3.633	0.839						
MYT_9	1.291	0.056	10	2.342	0.827	8.9526	9	9E-06
MS_II_19	3.633	0.839						
MYT_11	1.4	0.095	10	2.233	0.85	8.3077	9	2E-05
MS_II_19	3.633	0.839						
MYT_13	1.582	0.086	10	2.051	0.832	7.7927	9	3E-05
MS_II_19	3.633	0.839						
MYT_15	1.794	0.069	10	1.839	0.84	6.9197	9	7E-05
MS_II_19	3.633	0.839						
MYT_17	1.993	0.07	10	1.64	0.84	6.1733	9	2E-04
MS_II_19	3.633	0.839						
MYT_19	2.186	0.115	10	1.447	0.851	5.3746	9	4E-04
MS_II_19	3.633	0.839						
MYT_21	2.363	0.158	10	1.27	0.874	4.5974	9	0.001
MS_II_19	3.633	0.839						
MYT_23	2.431	0.124	10	1.202	0.865	4.3929	9	0.002
MS_II_19	3.633	0.839						
MYT_25	2.511	0.107	10	1.122	0.858	4.1343	9	0.003
MS_II_19	3.633	0.839						
MYT_27	2.605	0.161	10	1.028	0.879	3.6995	9	0.005
MS_II_21	3.704	0.51						
MYT_1	1	0	10	2.704	0.51	16.764	9	4E-08
MS_II_21	3.704	0.51						
MYT_3	1.11	0.024	10	2.594	0.499	16.455	9	5E-08
MS_II_21	3.704	0.51						

MYT_5	1.166	0.028	10	2.538	0.497	16.141	9	6E-08
MS_II_21	3.704	0.51						
MYT_7	1.242	0.049	10	2.462	0.489	15.935	9	7E-08
MS_II_21	3.704	0.51						
MYT_9	1.291	0.056	10	2.413	0.501	15.227	9	1E-07
MS_II_21	3.704	0.51						
MYT_11	1.4	0.095	10	2.304	0.542	13.441	9	3E-07
MS_II_21	3.704	0.51						
MYT_13	1.582	0.086	10	2.122	0.53	12.663	9	5E-07
MS_II_21	3.704	0.51						
MYT_15	1.794	0.069	10	1.91	0.516	11.712	9	9E-07
MS_II_21	3.704	0.51						
MYT_17	1.993	0.07	10	1.711	0.523	10.338	9	3E-06
MS_II_21	3.704	0.51						
MYT_19	2.186	0.115	10	1.518	0.534	8.9972	9	9E-06
MS_II_21	3.704	0.51						
MYT_21	2.363	0.158	10	1.341	0.578	7.3309	9	4E-05
MS_II_21	3.704	0.51						
MYT_23	2.431	0.124	10	1.273	0.566	7.1111	9	6E-05
MS_II_21	3.704	0.51						
MYT_25	2.511	0.107	10	1.193	0.549	6.8771	9	7E-05
MS_II_21	3.704	0.51						
MYT_27	2.605	0.161	10	1.099	0.595	5.8445	9	2E-04
MS_II_23	4.066	0.588						
MYT_1	1	0	10	3.066	0.588	16.478	9	5E-08
MS_II_23	4.066	0.588						
MYT_3	1.11	0.024	10	2.956	0.576	16.219	9	6E-08
MS_II_23	4.066	0.588						
MYT_5	1.166	0.028	10	2.9	0.575	15.95	9	7E-08
MS_II_23	4.066	0.588						
MYT_7	1.242	0.049	10	2.824	0.566	15.789	9	7E-08
MS_II_23	4.066	0.588						
MYT_9	1.291	0.056	10	2.775	0.578	15.185	9	1E-07
MS_II_23	4.066	0.588						
MYT_11	1.4	0.095	10	2.666	0.618	13.646	9	3E-07
MS_II_23	4.066	0.588						
MYT_13	1.582	0.086	10	2.484	0.608	12.93	9	4E-07
MS_II_23	4.066	0.588						
MYT_15	1.794	0.069	10	2.272	0.596	12.062	9	7E-07
MS_II_23	4.066	0.588						
MYT_17	1.993	0.07	10	2.073	0.604	10.859	9	2E-06
MS_II_23	4.066	0.588						

MYT_19	2.186	0.115	10	1.88	0.618	9.6248	9	5E-06
MS_II_23	4.066	0.588						
MYT_21	2.363	0.158	10	1.703	0.664	8.1097	9	2E-05
MS_II_23	4.066	0.588						
MYT_23	2.431	0.124	10	1.635	0.651	7.9427	9	2E-05
MS_II_23	4.066	0.588						
MYT_25	2.511	0.107	10	1.555	0.633	7.7726	9	3E-05
MS_II_23	4.066	0.588						
MYT_27	2.605	0.161	10	1.461	0.674	6.8598	9	7E-05
MS_II_25	4.422	0.672						
MYT_1	1	0	10	3.422	0.672	16.1	9	6E-08
MS_II_25	4.422	0.672						
MYT_3	1.11	0.024	10	3.312	0.66	15.875	9	7E-08
MS_II_25	4.422	0.672						
MYT_5	1.166	0.028	10	3.256	0.658	15.636	9	8E-08
MS_II_25	4.422	0.672						
MYT_7	1.242	0.049	10	3.18	0.649	15.501	9	8E-08
MS_II_25	4.422	0.672						
MYT_9	1.291	0.056	10	3.131	0.661	14.981	9	1E-07
MS_II_25	4.422	0.672						
MYT_11	1.4	0.095	10	3.022	0.7	13.654	9	3E-07
MS_II_25	4.422	0.672						
MYT_13	1.582	0.086	10	2.84	0.691	12.994	9	4E-07
MS_II_25	4.422	0.672						
MYT_15	1.794	0.069	10	2.628	0.681	12.208	9	7E-07
MS_II_25	4.422	0.672						
MYT_17	1.993	0.07	10	2.429	0.689	11.152	9	1E-06
MS_II_25	4.422	0.672						
MYT_19	2.186	0.115	10	2.236	0.705	10.023	9	4E-06
MS_II_25	4.422	0.672						
MYT_21	2.363	0.158	10	2.059	0.753	8.6525	9	1E-05
MS_II_25	4.422	0.672						
MYT_23	2.431	0.124	10	1.991	0.739	8.5182	9	1E-05
MS_II_25	4.422	0.672						
MYT_25	2.511	0.107	10	1.911	0.72	8.3886	9	2E-05
MS_II_25	4.422	0.672						
MYT_27	2.605	0.161	10	1.817	0.757	7.5872	9	3E-05
MS_II_27	4.61	0.662						
MYT_1	1	0	10	3.61	0.662	17.232	9	3E-08
MS_II_27	4.61	0.662						
MYT_3	1.11	0.024	10	3.5	0.651	17.009	9	4E-08
MS_II_27	4.61	0.662						

MYT_5	1.166	0.028	10	3.444	0.65	16.767	9	4E-08
MS_II_27	4.61	0.662						
MYT_7	1.242	0.049	10	3.368	0.641	16.625	9	5E-08
MS_II_27	4.61	0.662						
MYT_9	1.291	0.056	10	3.319	0.652	16.091	9	6E-08
MS_II_27	4.61	0.662						
MYT_11	1.4	0.095	10	3.21	0.691	14.696	9	1E-07
MS_II_27	4.61	0.662						
MYT_13	1.582	0.086	10	3.028	0.682	14.041	9	2E-07
MS_II_27	4.61	0.662						
MYT_15	1.794	0.069	10	2.816	0.671	13.278	9	3E-07
MS_II_27	4.61	0.662						
MYT_17	1.993	0.07	10	2.617	0.677	12.217	9	7E-07
MS_II_27	4.61	0.662						
MYT_19	2.186	0.115	10	2.424	0.695	11.03	9	2E-06
MS_II_27	4.61	0.662						
MYT_21	2.363	0.158	10	2.247	0.741	9.5907	9	5E-06
MS_II_27	4.61	0.662						
MYT_23	2.431	0.124	10	2.179	0.728	9.4627	9	6E-06
MS_II_27	4.61	0.662						
MYT_25	2.511	0.107	10	2.099	0.71	9.344	9	6E-06
MS_II_27	4.61	0.662						
MYT_27	2.605	0.161	10	2.005	0.744	8.5163	9	1E-05

Tabla 16. PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS DE BARTLETT X_i^2 .

Medios	Bartlett X^2	g.l.	p
MS-II	98.309372 %	12	1.27E-15
Myt	48.423702 %	12	2.67E-06

Tabla 17. ANÁLISIS DE VARIANZA. PRUEBA DE F.

Efectos significativos con p < .05000								
Medios	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	S. C. del error	g.l. error	C.M. error	F	p
MS_II	200.23	13	15.402	20.602	126	0.1635	94.2	0
MYT	43.312	13	3.3317	1.1162	126	0.0089	376.1	0

Tabla 18. PRUEBA DE TUKEY PARA EL MEDIO MS-II DEL ENSAYO 2.

Prueba de Tukey DVS variable MS_II														
Valores muy parecidos, cercanos a 1 en rojo														
	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27
	1.000000	1.028000	1.291000	1.556000	1.851000	2.140000	2.431000	2.726000	2.981000	3.333000	3.704000	4.066000	4.422000	4.610000
1		1	0.94421290.1131856	0.0002322	2.307E-05	2.301E-05								
3		1	0.97523870.1689845	0.000465	2.307E-05	2.301E-05								
5	0.9442129	0.9752387	0.9736093	0.1065524	0.000244	2.307E-05	2.301E-05							
7	0.1131856	0.16898450.9736093	0.9381676	0.0729883	0.0001305	2.301E-05								
9	0.0002322	0.000465	0.10655240.9381676	0.9470718	0.0778845	0.0001305	2.307E-05	2.301E-05						
11	2.307E-05	2.307E-05	0.000244	0.0729883	0.9470718	0.9442129	0.0706372	0.0002972	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05
13	2.301E-05	2.301E-05	2.307E-05	0.0001305	0.0778845	0.9442129	0.9381676	0.1237383	7.266E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05
15	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	0.0001305	0.0706372	0.9381676	0.9809926	0.0495258	2.778E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05
17	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.307E-05	0.0002972	0.1237383	0.9809926	0.8006862	0.0049847	2.313E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05
19	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	7.266E-05	0.0495258	0.8006862	0.7346241	0.0039934	2.313E-05	2.301E-05	2.301E-05
21	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.778E-05	0.0049847	0.7346241	0.7669756	0.0055625	6.7E-05	6.7E-05
23	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.313E-05	0.0039934	0.7669756	0.7875034	0.1350356	0.1350356
25	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.313E-05	0.0055625	0.7875034	0.999001	0.999001
27	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	6.7E-05	0.1350356	0.999001	0.999001

Tabla 19. PRUEBA ESTADÍSTICA DE TUKEY PARA EL MEDIO MYT DEL ENSAYO 2.

Prueba de Tukey DVS variable MYT														
Valores muy parecidos, cercanos a 1 en rojo														
	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27
	1.000000	1.110000	1.166000	1.242000	1.291000	1.400000	1.582000	1.794000	1.993000	2.186000	2.363000	2.431000	2.511000	2.605000
1		0.33152	0.00617892	2.354E-05	2.301E-05									
3	0.33152		0.98866850	0.0955432	0.0014119	2.301E-05								
5	0.0061789	0.9886685		0.8741918	0.1491386	2.491E-05	2.301E-05							
7	2.354E-05	0.09554320	0.8741918		0.9968242	0.0127358	2.301E-05							
9	2.301E-05	0.00141190	0.14913860	0.9968242		0.3468956	2.301E-05							
11	2.301E-05	2.301E-05	2.491E-05	0.0127358	0.3468956		0.0012735	2.301E-05						
13	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	0.0012735		6.139E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05
15	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	6.139E-05		0.0002111	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05
17	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	0.0002111		0.0003986	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05
19	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	0.0003986		0.002121	2.342E-05	2.301E-05	2.301E-05
21	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	0.002121		0.9425331	0.0294689	2.354E-05
23	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.342E-05	0.9425331		0.8266869	0.0028778
25	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	0.0294689	0.8266869		0.6049792
27	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.301E-05	2.354E-05	0.0028778	0.6049792	

Tabla 20. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA PARA LA REGENERACIÓN DE BROTES.

Medios	Valor N	Media	Confianza -95.000%	Confianza +95.000%	Mediana	Mínimo	Máximo	Cuartil + bajo	Cuartil + alto	Rango cuartil	Desviación estándar
MS_II	84	21.667	19.92523	23.408103	20	2	40	15.5	28	12.5	8.024561
MYT	50	13.16	11.27279	15.047211	11	5	30	10	20	10	6.640506

9. BIBLIOGRAFÍA

1. ACOSTA, E., J. Sánchez y M. Bañón. **2000**. Auxinas. En: Azcón-Bieto, J. y M. Talón (Eds.). Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill. España. Pp. 305-323.
2. ALBERTS, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J. Watson. **1996**. Biología Molecular de la Célula. 3ª edición. Ediciones Omega S. A. Barcelona. 1387 pp.
3. ÁLVAREZ, A. **1994**. Cultivo de callos. En: Hurtado, D. y M. Merino (Eds.). Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas. México. Pp. 93-100.
4. ÁLVAREZ, A. **1994**. Reguladores del crecimiento vegetal. En: Hurtado, D. y M. Merino (Eds.). Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas. México. Pp. 48-66.
5. ALVARADO, Y. **1998**. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Pérez, J. (Ed.). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. Pp. 81-104.
6. AKASAKA-KENNEDY, Y., K. Tomita y H. Ezura. **2004**. Efficient plant regeneration and *Agrobacterium* - mediated transformation via somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.) *Plant Science*. **166**:763-769.
7. BARZ, W. y K. Oksman. **2002**. Plant biotechnology. An emerging field. En: K. Marja, K. Oksman y W. Barz (Eds.). Plant biotechnology and transgenic plants. Ed. Marcel Dekker Inc. Nueva York. Pp. 1-21.
8. BONILLA, G. **1999**. Diferenciación de brotes adventicios de Caoba. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias. UNAM. 75 pp.
9. CELIS, A. **2004**. Bioestadística. Ed. Manual Moderno. México. 374 pp.
10. CRONQUIST, A. **1988**. The evolution and classification of flowering plants. Arthur Cronquist 2. New York Botanical Garden. New York. 555 pp.
11. CHÁVEZ, V. **1993**. Embriogénesis somática a partir de folíolos jóvenes de plantas maduras de *Ceratozamia Mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Zamiaceae) especie en peligro de extinción. Tesis de Doctorado en Ciencias, Facultad de Ciencias. UNAM. 148 pp.
12. DANIEL, W. **2002**. Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa. México. 755 pp.
13. DODDS, J. y L. Roberts. **1982**. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press. USA. 178 pp.

14. DE LIÑAN, C. **1997**. Farmacología Vegetal. Ediciones Agrotécnia, S.F. España. 1196 pp.
15. DIRKS, R. y M. Buggenum. **1989**. *In vitro* plant regeneration from leaf and cotyledon explants of *Cucumis melo* L. *Plant Cell Reports*. **7**: 626-627.
16. ESAU, K. **1985**. Anatomía vegetal. Omega. Barcelona. 779 pp.
17. ESPINOZA, J. (editor). **2002**. El melón: Tecnologías de producción y comercialización. CELALA, CIRNOC, INIFAP. México. 245 pp.
18. EZURA, H., I. Kikuta, K. Oosawa. **1997**. Long-term ploidy stability of shoot primordium cultures and produced plant of melon. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **48**: 31–35.
19. FANG, G. y R. Grumet. **1990**. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants. *Plant Cell Reports*. **9**:160-164.
20. GARCIA-CAMPUSANO, F. **2003**. Ontogenia de brotes adventicios mediante el cultivo *in vitro* de embriones maduros de *Pseudotsuga macrolepis*, Flous. Tesis de Maestría en ciencia biológicas. Facultad de Ciencias. UNAM. 89 pp.
21. GEORGE, E. y P. Sherrington. **1984**. Plant propagation by tissue culture. Ed. Exegetics Limited. Inglaterra. 709 pp.
22. GONSALVES, C., B. Xue, M. Yepes, M. Fuchs, K. Ling, S. Namba, P. Cheen, J. Slightom y D. Gonsalves. **1994**. Transferring cucumber mosaic virus-white leaf strain coat protein gene into *Cucumis melo* L. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **119**:345-355.
23. HERMAN, E. **1991**. Recent advances in plant tissue culture. Regeneration, micropropagation and media. 1988-1991. Agritech Consultants, Inc. USA. 76 pp.
24. HERMAN, E. **1995**. Recent advances in plant tissue culture. Vol. III. Regeneration and micropropagation: Techniques, systems and media, 1991-1995. Agritech Consultants, Inc. USA. 94 pp.
25. HERNÁNDEZ, M. **2003**. Resumen: Cultivo de tejidos vegetales: modelos biológicos. En: Diplomado en Cultivo de Tejidos Vegetales bloque III. Fac. Química UNAM.
26. JAMESNY, A. (Coor.) **1997**. Melones. Compendios de horticultura Tomo 10. Ed. Ediciones de horticultura. España. Pp. 277.
27. KATHAL, R., S. Bhatnagar y S. Bhojwani. **1988**. Regeneration of plants from leaf explants of *Cucumis melo* cv. Pusa Sharbati. *Plant Cell Reports*. **7**:449-451.

28. KATHAL, R., S. Bhatnagar y S. Bhojwani. **1994**. Plant regeneration from the callus derived from root explants of *Cucumis melo* L. cv. Pusa sharbati. *Plant Sci.* **96**: 137-142.
29. LESHEM, B., R. Ronen y S. Lurie. **1994**. Thidiazuron and paclobutrazol appear to mimic cytokinin and auxin influences on organ regeneration and protein profiles in cultured melon cotyledons. *J. Plant Physiol.* **143**: 344–348.
30. LESHEM, B. **1989**. Polarity and responsive regions for regeneration in the culture melon cotyledon. *J. Plant Physiol.* **135**: 237-239.
31. LESHEM, B., R. Ronen, E. Soudry, S. Lurie y S. Gepstein. **1994**. Cytokinin at a large range of concentration determines rates of polypeptide metabolism and regeneration in cultured melon cotyledons. *J. Plant Physiology.* **143**: 330–336.
32. LESHEM, B., R. Ronen, E. Soudry, S. Lurie y S. Gepstein. **1995**. Cytokinin and white light coact to enhance polypeptide metabolism and shoot regeneration in cultured melon cotyledons. *J. Plant Physiol.* **145**: 291-295.
33. LIBORIO, C., B. Januzzi, S. Stefano y A. Martinelli. **2001**. *In vitro* morphogenesis of *Cucumis melo* var. *inodorus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **65**: 81–89.
34. LINDSEY, K. y M. Jones. **1989**. Biotecnología vegetal agrícola. Ed. ACRIBIA. España. 273 pp.
35. LÓPEZ- CURTO, M., J. Márquez y G. Murguía. **1998**. Técnicas para el estudio del desarrollo de angiospermas. Coordinación de Servicios Editoriales de la Facultad de Ciencias de la UNAM. México. 116 pp.
36. LOZOYA, H. **1985**. Embriogénesis somática. Fundamentos teórico prácticos del cultivo de tejidos. UACH. México. 103 pp.
37. MARGARA, J. **1988**. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la organogénesis. Ediciones Mundi-Prensa. España. 230 pp.
38. MAROTO, J. **1994**. Horticultura herbácea especial. 4ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. España. 607 pp.
39. MAUSETH, J. **1988**. Plant Anatomy. The Benjamín/Cummings Publishing Company, Inc. U.S.A. 560 pp.
40. MERE, G y V. Vázquez. **2003**. Bombardeo de callos embriogénicos de zanahoria (*Daucus carota* L.) y su regeneración con la proteína “G” del virus de la rabia. Tesis de licenciatura (Químico en alimentos), Facultad de Química. UNAM. México. 116 pp.

41. NARAYANASAMY, P. **2002**. Microbial plant pathogens and crop disease management. Science Publishers, Inc. USA. 553 pp.
42. NIEDZ, R., S. Schiller, K. Dunbar, C. Stephens y H. Murakishi. **1989**. Factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **18**: 313-319.
43. PAPADOPOULOU, E. y R. Grumet. **2002**. Production of transgenic melon. En: Khachtourians, G., A. McHughen, R. Scorza, W. Nip y Y. Hui (Eds.). *Transgenic-Plants and corps*. Marcel Dekker, Inc. New York. Pp. 371-381.
44. PARSON, D. **1992**. Manual para agropecuaria: Cucurbitáceas. Editorial S.E.P. Trillas. México. 56 pp.
45. PÉREZ, A. y V. Abraira. **1996**. Bioestadística. Centro de Estudios Ramón Areces, S. A. Madrid. 269 pp.
46. PIERIK, R. **1990**. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 324 pp.
47. PHILLIPS, B. y J. HUBSTENBERG. **1995**. Chapter 4. Micropropagation by proliferation of Axilar Bud. En: O. Gamborg y C. Phillips (Eds.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture Fundamental Methods*. Springer. Germany. Pp. 45–54.
48. RAYMOND, G. **1999**. Vegetable seed production. 2ª edición. CABI Publishing. Inglaterra. 328 pp.
49. RAZDAN, M. **2003**. Introduction to plant tissue culture. Science Publishers, Inc. USA. 375 pp.
50. RHIMI, A., N. Ben y M. Boussaid. **2006**. Plant regeneration via somatic embryogenesis from *in vitro* tissue culture in two Tunisian *Cucumis melo* cultivars Maazoun and Beji. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **84**:239–243.
51. ROBERT, M y V. Loyola. **1986**. El cultivo de tejidos vegetales en México. En: Robert, M. y M. Loyola (Comp.). *El cultivo de tejidos vegetales en México*. CECY. México. Pp. 21–26.
52. ROBERT, M. **1986**. El potencial del cultivo de *in vitro* de células vegetales en el mejoramiento genético de las plantas. En: Robert, M. y M. Loyola (Comp.). *El cultivo de tejidos vegetales en México*. CECY. México. Pp. 89–110.
53. SÁNCHEZ, E. **1986**. El cultivo de tejidos vegetales en la investigación básica. En: Robert, M. y M. Loyola (Comp.). *El cultivo de tejidos vegetales en México*. CECY. México. Pp. 111–124.

54. SÁNCHEZ - SERRANO, J. **2000**. Tecnologías de producción de plantas transgénicas. En: SEBIOT. La biotecnología aplicada a la agricultura. Ediciones Mundi-Prensa. España. Pp. 55–68.
55. SCHWARZ O. y R. Beauty. **2000**. Chapter 14. Organogenesis. En: Trigiano R. y D. Gray (Eds.). Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press. USA. Pp. 125–137.
56. SEGURA, J. **2000**. Citoquininas. En: Azcón-Bieto, J. y M. Talón (Eds.). Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill. España. Pp. 343–360.
57. SHETTY, K., M. Ohshima, T. Murakami, K. Oosawa y Y. Ohashi. **1997**. Transgenic melon (*Cucumis melo* L.) and potential for expression of novel proteins important to food industry. *Food Biotechnology*. **11(2)**:111-128.
58. SHETTY, K., G. Shetty, Y. Nakazaki, K. Yoshioka, Y. Asano y K. Oosawa. **1992**. Simulation of benzyladenine – induced *in vitro* shoot organogenesis in *Cucumis melo* L. by proline salicylic acid an aspirin. *Plant Science*. **84**:193-199.
59. SINGH, M., A. Mirsa y S. Bhatnagar. **1996**. *In vitro* production of plants from cotyledon explants of *Cucumis melo* L. and their successful transfer to field. *Phytomorphology*. **46(4)**: 395-402.
60. STATISTICA for Windows. **1995**. StatSoft, Inc. U.S.A
61. SU, W. **2002**. Chapter 10: Cell culture and regeneration of plant tissues. En: G. Khachatourians, A. McHughen, R. Scorza, W. Nip, Y. Hui (Eds.). Transgenic-Plants and Corps. Ed. Marcel Dekker Inc. Nueva York. Pp. 151–167.
62. TABELI, Y., T. Kanno y T. Nishio. **1991**. Regulation of organogenesis and somatic embryogenesis by auxin in melon, *Cucumis melo* L. *Plant Cell Reports*. **10**: 225-229.
63. TIGERSTEDT, P. y A. Niskanen. **2002**. Plant Cell and Tissue Culture Techniques. Used in Plant Breeding. En: K. Oksman, W. Barz (Eds.). Plant Biotechnology and Transgenic Plants. Ed. Marcel Dekker Inc. Nueva York. Pp. 59–76.
64. URIBE, L. **1998**. Influencia de distintos antioxidantes sobre brotación y crecimiento *in vitro* de Ceiba (*Ceiba pentandra*). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. UNAM. 69 pp.
65. VALLÉS, M. y J. Lasa. **1994**. *Agrobacterium*-mediated transformation of commercial melon (*Cucumis melo* L., cv. Amarillo Oro). *Plant Cell Reports*. **13**:145-148.

66. VILLAVISCENCO, L. **2002**. Optimización y caracterización fisiológica y bioquímica de cultivos en suspensión de células de maíz (*Zea mays*, L. raza chalqueño). Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias. UNAM. México. 107 pp.
67. VERA, E. **1994**. Bioestadística aplicada al cultivo de tejidos vegetales. En: Hurtado D. Y M. Merino (Eds.). Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas. México. Pp. 162-198.
68. YAACOB, O. **1995**. The production of economy fruit in South-East Asia. University Press. Oxford. 419 pp.
69. ZAPATA, M., P. Fernández, S. Bañon y P. Roth. **1989**. El melón. Ediciones Mundi-Prensa. España. 174 pp.

Páginas en red:

- <http://www.biologia.edu.art>
- <http://www.botany.cs.tamu.edu>
- <http://www.cebac.com.ar>
- <http://www.colinagro.com.co>
- <http://www.es.wikipedia.org>
- <http://www.evita.upv.es>
- <http://www.farmaciasahumada.cl>
- <http://www.healthfraud.org>
- <http://www.healthtoch.com>
- <http://www.hort.purdue.edu>
- <http://www.ilustrados.com>
- <http://www.imss.gob.mx>
- <http://www.infoagro.com>
- <http://www.koning.ecsu.ctstateu.edu>
- <http://www.mantra.com.ar>
- <http://www.micro.magnet.fsu.edu>
- <http://www.microbiologia.com.ar>
- <http://www.mobot.mobot.org>
- <http://www.nlm.nih.gov>

- <http://www.oaki2.si.gunma-u.ac.jp>
- <http://www.omega.ilce.edu.mx>
- <http://www.plantphys.info>
- <http://www.plantatlas.usef.edu>
- <http://www.rincondelvago.com>
- <http://www.rxlist.com>
- <http://www.sagarpa.gob.mx>
- <http://www.uc.org>
- <http://www.vegefund.com>
- <http://www.viatusalud.com>