



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

DESARROLLO DE MÉTODOS DE PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL ALCAPARRO (*Capparis spp.*)

PRESENTA

IBQ. Fabián Contreras Loera

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA
VEGETAL

TUTOR

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch

COMITÉ TUTORAL

Dr. José Francisco Morales Domínguez
M. en C. Lucía Isabel Chávez Ortíz.

Aguascalientes, Ags, 14 de Noviembre del 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

**M EN C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E**

Por medio del presente como tutor designado del estudiante **FABIÁN CONTRERAS LOERA** con ID 36004, quien realizó la tesis titulada: **DESARROLLO DE MÉTODOS DE PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL ALCAPARRO (*Capparis spp.*)**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 3 de noviembre de 2016

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch
Tutor de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

Departamento de Química



ANIVERSARIO
UAA

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como asesor designado del estudiante **FABIÁN CONTRERAS LOERA** con ID 36004, quien realizó la tesis titulada: **DESARROLLO DE MÉTODOS DE PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL ALCAPARRO (*Capparis spp.*)**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 3 de noviembre de 2016


Dr. José Francisco Morales Domínguez
Asesor de Tesis

c.c.p. - Interesado
c.c.p. - Secretaria de Investigación y Posgrado
c.c.p. - Jefatura del Depto. de Química
c.c.p. - Consejero Académico
c.c.p. - Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química

**M EN C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E**

Por medio del presente como asesor designado del estudiante **FABIÁN CONTRERAS LOERA** con ID 36004, quien realizó la tesis titulada: **DESARROLLO DE MÉTODOS DE PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL ALCAPARRO (*Capparis spp.*)**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 3 de noviembre de 2016

MC Lucía Isabel Chávez Ortiz
Miembro del Comité Tutoral

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaria de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depo. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

FABIÁN CONTRERAS LOERA
MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREA BIOTECNOLOGÍA
PRESENTE.

Estimado alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“Desarrollo de métodos de propagación *in vitro* del alcaparro (*Capparis spp.*)”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 08 de noviembre de 2016

“Se lumen proferre”

EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por la beca No. 392256 otorgada para la realización de estos estudios. A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo financiero brindado al proyecto (PIBT-16-2).

Al Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch, al Dr. José Francisco Morales Domínguez y a la M. en C. Lucía Isabel Chávez Ortíz; por su asesoría, apoyo continuo y revisión de este trabajo.

Al M. en C. Alberto Isaac Reyes Silva, por sus consejos en la etapa de aclimatación en el invernadero, a la IIQ. Martha Evelia Pérez Reyes por su ayuda en el laboratorio de biotecnología, a la Dra. Angélica Hernández Quintero, por su apoyo y explicaciones en el análisis estadístico y a todos los que de forma directa o indirecta influyeron en la realización de este proyecto.

A mi esposa Mónica Sarai de Alba Jiménez, por su ánimo, paciencia, apoyo y comprensión.

ÍNDICE GENERAL

Índice de tablas.....	4
Índice de figuras.....	6
Acrónimos.....	7
Resumen.....	9
Summary.....	10
Introducción.....	11
Capítulos	
1. Antecedentes.....	13
1.1 Generalidades sobre el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV).....	13
1.1.1 Principios básicos del CTV.....	13
1.1.2 Tipos de CTV.....	16
1.1.3 Radiación Fotosintéticamente Activa (RFA).....	17
1.2 Composición del medio de cultivo.....	18
1.2.1 Macronutrientes.....	20
1.2.2 Micronutrientes.....	22
1.2.3 Fuente de carbono.....	25
1.2.4 Otros elementos.....	26
1.3 Reguladores del crecimiento vegetal.....	29
1.3.1 Auxinas.....	32
1.3.2 Citocininas.....	33
1.4 Micropropagación.....	35
1.4.1 Ventajas y desventajas.....	36
1.4.2 Etapas básicas.....	37
1.4.3 Propagación por medio de yemas, ápices y meristemos.....	41
1.5 Biorreactores.....	44
1.5.1 Tipos de Biorreactores en el CTV.....	46
1.5.2 Sistemas de Inmersión Temporal.....	47
1.6 Generalidades de la especie <i>Capparis spinosa</i>	51

1.6.1	Descripción botánica (morfología), origen y distribución.....	51
1.6.2	Condición ambiental y cultivo.....	53
1.6.3	Etnofarmacología.....	54
1.6.4	Fitoquímica.....	56
1.6.5	Actividades Biológicas.....	58
1.7	Antecedentes sobre el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Capparis spp.</i>	59
1.7.1	Ruptura de Dormancia.....	60
1.7.2	Propagación.....	63
1.7.3	Enraizamiento.....	67
1.7.4	Aclimatación.....	71
2.	Justificación.....	74
3.	Hipótesis.....	74
4.	Objetivos.....	75
5.	Metodología.....	76
5.1	Procedimiento de desinfección y ruptura de dormancia (germinación)....	76
5.2	Material Vegetal.....	77
5.3	Pruebas con los RCV.....	77
5.4	Análisis Estadístico.....	78
5.5	Enraizamiento.....	78
5.6	Aclimatación.....	78
5.7	Biorreactores.....	79
6.	Resultados.....	80
6.1	Germinación.....	80
6.2	Pruebas con RCV.....	80
6.3	Análisis Estadístico.....	85
6.4	Enraizamiento.....	86
6.5	Aclimatación.....	87
6.6	Biorreactores.....	89
	Discusiones.....	96
	Conclusiones.....	103
	Bibliografía.....	104

Anexos

Preparación del Medio MS (Murashige y Skoog 1962)..... A

Valores-p..... C



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de auxinas más utilizadas en el CTV.....	33
Tabla 2. Ejemplos de citocininas más usadas en el CTV.....	34
Tabla 3. Ejemplos de otros reguladores del crecimiento y sustancias afines utilizadas en el CTV.....	35
Tabla 4. Usos tradicionales actuales del alcaparro alrededor del mundo.....	55
Tabla 5. Constituyentes químicos en diferentes partes de la especie <i>Capparis spinosa</i>	57
Tabla 6. Actividades biológicas de diferentes extractos de plantas de alcaparro.....	59
Tabla 7. Resumen de los diferentes tratamientos utilizados para detener la dormancia de las semillas.....	61
Tabla 8. Resumen de los diferentes tratamientos aplicados para el cultivo y propagación <i>in vitro</i> de <i>Capparis spinosa</i>	64
Tabla 9. Resumen de los diferentes tratamientos para el enraizamiento de <i>Capparis spinosa</i>	69
Tabla 10. Resumen de los diferentes tratamientos de aclimatación para <i>Capparis spinosa</i>	72
Tabla 11. Resumen de los brotes obtenidos en el tratamiento control (sin fitohormonas).....	81
Tabla 12. Resumen de datos obtenidos con cada fitohormona a las concentraciones indicadas.....	81
Tabla 13. Apariencia de los brotes y de las masas de brotes en cada tratamiento con las fitohormonas.....	82
Tabla 14. Resumen de datos obtenidos con la combinación de NAA (0.5 mg/L), con distintas hormonas a las concentraciones indicadas.....	83
Tabla 15. Apariencia de los brotes y de las masas de brotes en cada tratamiento, con NAA (0.5 mg/L) y las respectivas fitohormonas.....	84
Tabla 16. Resumen del porcentaje de enraizamiento de los diferentes tratamientos, en medio MS y MS con carbón, sometidos a luz blanca y RFA.....	87

Tabla 17. Apariencia de las plántulas de los diferentes tratamientos de enraizamiento..... 87

Tabla 18. Porcentaje de sobrevivencia de las plántulas respecto a los distintos protocolos de aclimatación..... 88

Tabla 19. Apariencia de los brotes de alcaparro en los biorreactores con medio MS complementado con BA a 4 y 6 inmersiones..... 90

Tabla 20. Apariencia de los brotes en los biorreactores con medio MS complementado con 2iP a 4 y 6 inmersiones..... 92



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principios básicos del CTV y comportamiento de los cultivos.....	15
Figura 2. Principales métodos de micropropagación.....	16
Figura 3. Espectro electromagnético donde se muestra la región de luz visible.....	17
Figura 4. Resumen de los diferentes factores que influyen en la respuesta de un tejido cultivado <i>in vitro</i> a la adición de RCV exógenos.....	30
Figura 5. Concentraciones relativas de auxinas y citocininas requeridas para generar distintas respuestas en el cultivo <i>in vitro</i> (crecimiento y morfogénesis).	31
Figura 6. Métodos alternativos de enraizamiento de brotes micropropagados..	40
Figura 7. Cultivo de nodos sencillos y múltiples.....	42
Figura 8. Cultivo de puntas apicales.....	43
Figura 9. Representación diagramática de algunos sistemas de inmersión temporal semiautomáticos.....	49
Figura 10. Dibujo morfológico de <i>Capparis spinosa</i> L.....	51
Figura 11. Morfología de diferentes órganos de la alcaparra.....	52
Figura 12. Distribución natural del alcaparro en Eurasia y el Norte de África...	52
Figura 13. Imágenes de distintos órganos del alcaparro.....	54
Figura 14. Apariencia de algunas de las plántulas germinadas.....	80
Figura 15. Gráfico resumen del número de brotes por explante de todos los tratamientos probados de las fitohormonas y sus respectivas concentraciones..	85
Figura 16. Gráficas de efectos relativos de los distintos tratamientos con RCV.	86
Figura 17. Apariencia general de las plantas del tratamiento de aclimatación...	88
Figura 18. Apariencia de algunas de las plántulas a los 188 días (casi 7 meses) de haber sido transferidas a suelo.....	89
Figura 19. Apariencia final de los brotes de los biorreactores.....	94

ACRÓNIMOS

μM	- Micromolar (10^{-6} M).
1/2MS	- Medio de cultivo MS a la mitad de su concentración o fuerza.
1/2MSD	- Medio de cultivo MS a la mitad de la fuerza de nitratos pero al doble de cloruro de calcio y de sulfato de magnesio.
2,4-D	- Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) A.
2iP	- 2-isopentenil-adenina (Isopentenyl adenine) C.
AIA (IAA)	- Ácido indolacético (Indole-3-acetic acid) A.
AIB (IBA)	- Ácido indolbutírico (Indole-3-butyric acid) A.
ANA (NAA)	- Ácido naftalenacético (α -naphthaleneacetic acid) A.
B5	- Medio de cultivo Gamborg et al., (1968).
BA (BAP)	- Benciladenina ó 6-bencilaminopurina (Benzyl-adenine ó 6-benzylaminopurine) C.
BIT®	- Twin Flasks system.
B.P.	- Years Before the Present.
Cin (KIN)	- Cinetina (Kinetin) C.
CO₂	- Dióxido de carbono.
CTV	- Cultivo de Tejidos Vegetales.
DMSO	- Dimethylsulfoxide.
EDTA	- Ácido etilendiaminotetraacético (Ethylenediaminetetraacetic acid).
GA₃	- Ácido giberélico ó giberelina.
GRF	- Growth Regulator Free medium.
Gy	- Gray (J/kg).
H₂SO₄	- Ácido sulfúrico.
HNO₃	- Ácido nítrico.
ICARDA	- Centro Internacional para la Investigación de la Agricultura en Zonas Áridas.
Kn	- 6-furfurylaminopurine.
KNO₃	- Nitrato de potasio.
L	- Litro(s).

MDPU	- Methylendioxyphenyl-urea.
MES	- Ácido 2-morfolino etanosulfónico.
mg	- Miligramos (10^{-3} g).
mM	- Milimolar (10^{-3} M).
MPa	- Megapascales (10^6 Pa).
MS	- Medio de cultivo Murashige-Skoog, (1962).
MT	- Metatopolina (Metatopolin) C.
nm	- Nanómetros (10^{-9} m).
pH	- Potencial hidrógeno.
ppm	- Partes por millón (mg/L).
Psi	- Libra por pulgada cuadrada (lb/in ²).
PVP	- Polivinilpirrolidona.
PVPP	- Polivinilpolipirrolidona.
RCV	- Reguladores de Crecimiento Vegetal (Fitohormonas).
RFA (PAR)	- Radiación Fotosintéticamente Activa (Photosynthetically Active Radiation).
RITA®	- Recipient for Automated Temporary Immersion system.
TDZ	- Tidiazurón (Thidiazuron) C.
WPM, WP	- Medio de cultivo Lloyd y McCown, (1980). Plantas leñosas.
Zea	- Zeatina.

RESUMEN

El alcaparro es una especie de alto valor medicinal, económico y ecológico. Muestra características muy interesantes para las regiones de clima semiseco, como Aguascalientes. Por estos motivos el cultivo del alcaparro puede ser una alternativa eficiente, productiva y rentable. Esta tesis aportará un nuevo protocolo de micropropagación para la producción eficiente de plántulas de esta especie pudiendo generar plantas suficientes para establecer parcelas o huertos experimentales.

Se desarrolló un sistema de micropropagación para la especie *Capparis spinosa* partiendo de material vegetal *in vitro*. Para la ruptura de dormancia y desinfección se utilizaron semillas de origen canadiense, el único método que funcionó para estimular la germinación fue la escarificación con H_2SO_4 . Diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento fueron evaluados, en dos diseños experimentales, para analizar su efecto sobre el número de brotes producidos por explante. Se observaron diferencias significativas en ambos diseños experimentales para el tipo de fitohormona, su concentración y la interacción. El mejor tratamiento en el primer diseño fue BA (2 mg/L) en MS con 1.86 brotes por explante, para el segundo diseño fue MS con BA (2 mg/L) y NAA (0.5 mg/L) con 3.6 brotes por explante.

El mejor tratamiento para enraizamiento fue 80% en MS. Se probaron dos distintas fuentes de iluminación (RFA y luz blanca) sin observar diferencias entre ambas. Se probaron distintos protocolos de aclimatación, siendo el mejor el que consiste en dejar floja la tapa de los frascos durante catorce días dentro del cuarto de cultivo, entonces pasar las plántulas al sustrato Mezcla ProMix[®], colocarlas en el invernadero tapándolas con bolsas transparentes por diecisiete días, siete días después retirar las bolsas transparentes y sacarlas plántulas del invernadero; con un resultado del 75% de sobrevivencia.

Se utilizaron biorreactores de inmersión temporal RITA[®], para obtener la mayor cantidad de brotes en menor tiempo, encontrando que el tratamiento que mayor número de brotes generó (89 brotes promedio por explante), fue en medio MS complementado con BA con 4 inmersiones diarias y con una periodicidad de 2 minutos para cada inmersión, durante 90 días.

SUMMARY

The caper is a species of high medicinal, economic and ecological value. It shows very interesting features for semi-dry climate regions, like Aguascalientes. For this reasons caper cultivation can be an efficient, productive and profitable alternative. This thesis will provide a new micropropagation protocol for the efficient production of seedlings of this species in order to generate enough plants to establish experimental plots or orchards.

It was developed a micropropagation system for the species *Capparis spinosa* starting from *in vitro* plant material. For breaking dormancy and disinfection Canadian seeds were used, the only method that worked to stimulate germination was scarification with H₂SO₄. Different combinations of growth regulators were evaluated in two experimental designs, to analyze its effect on the number of shoots produced by explant. Significant differences were observed in both experimental designs for the plant hormone type and concentration and interaction. The best treatment in the first design was BA (2 mg/L) in MS medium with 1.86 buds per explant, for the second design was MS with BA (2 mg/L) and NAA (0.5 mg/L) with 3.6 shoots per explant.

The best rooting result was 80% in MS medium, two different light sources were tested (RFA and white light) without differences between the two. Different hardening protocols were tested, being better consisting to let loose the top of the jars for fourteen days in the growing room, then move the plants to the ProMix[®] mix substrate, placing in the greenhouse covering them with transparent bags for seventeen days, seven days after removing the transparent bags and remove greenhouse plants; with a score of 75% survival.

Temporary immersion bioreactors RITA[®] were used, for the highest number of shoots in less time, finding that the best treatment which generated greater number of shoots (average 89 shoots per explant), was in MS medium supplemented with BA with 4 daily immersions and at intervals of 2 minutes for each immersion, for 90 days.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de métodos de micropropagación para nuevas especies vegetales, especialmente aquellas con valor económico, farmacéutico o forestal actualmente es una necesidad, para obtener mayores beneficios. Debido a las dificultades de la producción de alcaparro por métodos tradicionales se han buscado otras opciones: el alcaparro (*C. spinosa*), puede ser propagado *in vitro* de forma eficiente si se determinan las condiciones óptimas para cada una de las etapas de este proceso: establecimiento *in vitro*, multiplicación, enraizamiento, y adaptación y transferencia a suelo.

Existen ya reportes de procedimientos de micropropagación para el alcaparro, pero no se incluyen todas las etapas del proceso y en ninguno se hace referencia al uso de biorreactores para esta especie. El objetivo de este trabajo es desarrollar y establecer un protocolo eficiente y económicamente rentable para la producción de plántulas de alcaparro (*Capparis spinosa*).

La germinación de las semillas ocurre en un porcentaje muy bajo, ya sea por la dormancia fisiológica o física, por lo que la producción de plantas a partir de semillas no es muy eficaz. En los casos de dormancia se requieren tratamientos especiales para romperla, ya sean químicos o mecánicos; también se ha utilizado el método de cebado o primado. Las combinaciones de tratamientos de germinación son los que arrojan mejores resultados.

Para la propagación de alcaparro se han reportado distintos procedimientos de cultivo *in vitro* desarrollados para una proliferación rápida. Se han analizado los efectos del crecimiento bajo radiación gamma, con diferentes reguladores de crecimiento, a diferentes condiciones ambientales y utilizando distintos explantes.

Existe información de que el enraizamiento puede realizarse sin la aplicación de ningún tratamiento, mientras que en otros se necesitaron diferentes reguladores de crecimiento, generalmente auxinas, como es el caso de los tratamientos de pulso donde se realiza la inmersión de los brotes en soluciones con reguladores de crecimiento por tiempos cortos.

Existe evidencia de que la aclimatación de esta especie tiene porcentajes altos de sobrevivencia.

Por todo lo antes mencionado, el uso de técnicas de propagación *in vitro* pueden ser benéficas para el aprovechamiento comercial de esta especie. Pero la micropropagación convencional puede ser costosa por el uso de gelificantes y por el elevado número de operaciones manuales; una alternativa podría ser el uso de sistemas de inmersión temporal. Estos sistemas han reportado bastantes ventajas para distintas especies vegetales.



1. Antecedentes

1.1 Generalidades sobre el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es la ciencia del crecimiento de células vegetales, tejidos u órganos aislados de una planta madre, en medio artificial con condiciones controladas (axénicas). En algunos casos se puede conservar un organismo completo. El CTV incluye las técnicas y métodos que permiten cumplir con algunos objetivos prácticos ya que ofrece sistemas modelo para el estudio de la fisiología, bioquímica y genética vegetal, y por otro lado se aplica para la clonación y conservación *in vitro* de cualquier material vegetal. El requisito previo para que funcionen estos métodos es la totipotencia morfológica y química de cada célula vegetal (Endress, 1994; George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999; Thangadurai, 2007).

1.1.1 Principios Básicos del CTV

Existen tres principios básicos en los que se basa el CTV, los cuales deben ser comprendidos para ejercer una correcta manipulación de los mismos y poder así tener éxito en los trabajos que se emprendan en este campo. Los principios son:

La correcta elección del explante. El explante es el órgano, tejido o segmento de tejido vegetal que va a ser utilizado para iniciar el cultivo, puede utilizarse cualquier parte de la planta que contenga células vivas. Hay que tener siempre presente que el explante seleccionado determina, en gran parte, la respuesta obtenida; se debe de tener en cuenta el tipo de cultivo que se va a iniciar, el propósito del cultivo propuesto y las especies vegetales a utilizarse. Generalmente entre más joven y menos diferenciado sea un tejido, más fácil será su adaptación y respuesta al cultivo *in vitro*. Se debe de tener en cuenta que extraer un fragmento de tejido vegetal, de cualquier planta, conlleva obviamente, la ruptura de las relaciones con otros órganos, tejidos y células de la misma. Por lo que estas relaciones son de alguna manera subsanadas por el medio y las condiciones de cultivo (George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

La elección del medio y las condiciones de cultivo. La elección y formulación del medio de cultivo son otros factores importantes que determinan la respuesta del explante y el éxito del CTV. Se puede considerar que los medios de cultivo están formados, principalmente, de dos grupos de componentes: los esenciales y los opcionales. Los esenciales son los nutrientes que los tejidos vegetales necesitan para su desarrollo (nutrientes minerales, fuente de carbono y vitaminas). Los opcionales no son indispensables, ya que no se necesitan para mantener vivo al tejido vegetal, pero influyen en gran medida en la respuesta de los cultivos *in vitro*, aquí encontramos a los reguladores de crecimiento vegetal (RCV). Otros factores a tener en cuenta, porque también influyen en la respuesta del explante, son las condiciones físicas del cultivo (luz, fotoperiodo, temperatura y humedad) (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Las condiciones asépticas. Los medios que se usan en el CTV tienen alto contenido de carbohidratos, lo que los vuelve el medio ideal para el desarrollo de microorganismos y dado que los microorganismos y las células vegetales tienen requerimientos nutricionales muy parecidos se debe de esterilizar el medio de cultivo y los explantes utilizados para excluir cualquier organismo contaminante. Esto es de suma importancia porque las bacterias y los hongos se desarrollan mucho más rápido que los tejidos vegetales, provocando una serie de daños a los cultivos como pueden ser: que los cultivos vegetales sean cubiertos por microorganismos, los microorganismos pueden consumirla mayoría de los nutrientes del medio y también pueden excretar sus productos metabólicos dañando los tejidos vegetales (Endress, 1994; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Como se mencionó en el punto anterior, los explantes deben de esterilizarse (sobre todo los colectados en campo) para evitar la contaminación del medio de cultivo. La forma más común de esterilizar los explantes es someterlos a tratamientos con soluciones esterilizantes (hipoclorito de calcio, hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno, cloruro de mercurio y nitrato de plata, entre otras). Se debe de obtener la máxima esterilidad posible con la máxima sobrevivencia de tejido vegetal o con el menor daño potencial. Es recomendable determinar el método de esterilización más adecuado para cada tipo de

tejido vegetal, esto depende de varios factores: la concentración de la solución, la duración de la exposición a la solución y el daño mínimo de las células en contacto directo con la solución. En caso de existir regiones afectadas por la solución esterilizante, estas pueden ser removidas con herramientas estériles antes de iniciar el cultivo (Endress, 1994; George *et al.*, 2008). La esterilización del medio de cultivo se realiza con vapor de agua (autoclave), a una temperatura de 121 °C y una presión de 2-2.2 atm, de 15 a 20 minutos. La relación entre la temperatura y la presión, nos permite controlar la esterilización en autoclave por medio de un termómetro de punto final. Es importante purgar la autoclave porque estas temperaturas sólo se obtienen en vapor de agua saturado, en ausencia de aire (Endress, 1994).

Existen ciertos componentes necesarios para el medio de cultivo que son termolábiles (que se pueden degradar durante el proceso de esterilización por calor), por lo que deben

de ser esterilizados por medio de filtración en membranas estériles de 0.22 a 0.45 µm (Millipore). Si se trata de medio líquido, los componentes termolábiles se agregaran al medio cuando este se encuentre estéril y frío. Cuando se trate de medio semisólido, después de haber esterilizado hay que esperar a que el medio se enfríe de 45 a 50 °C para entonces agregar los compuestos termolábiles, previa-mente filtrados, se debe de mezclar bien y vaciar rápidamente en los

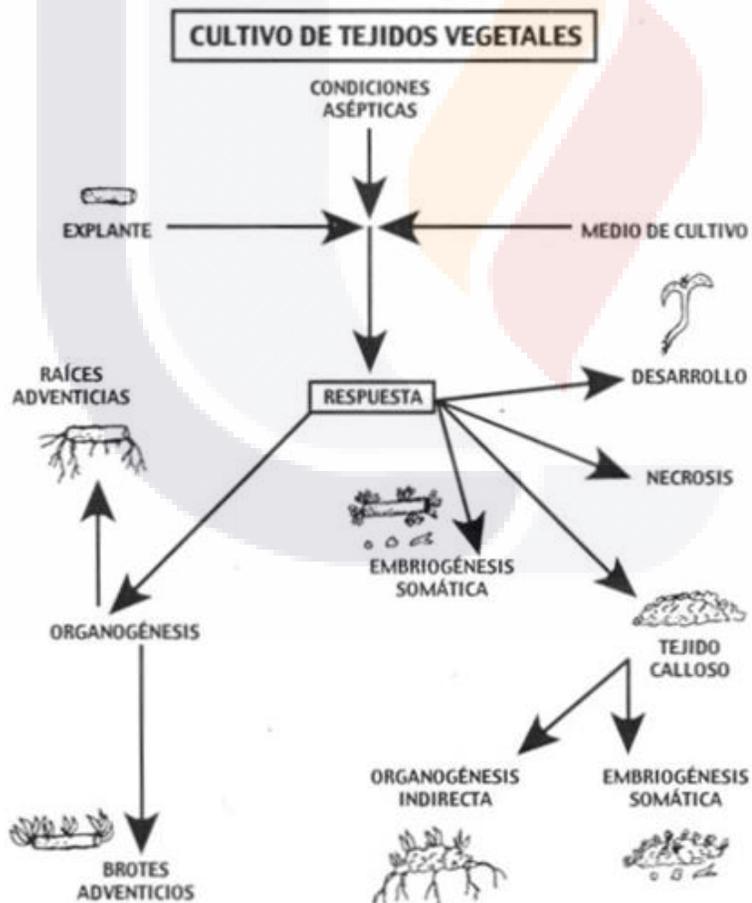


Figura 1. Principios básicos del CTV y comportamiento de los cultivos, modificado de Pérez Molphe Balch *et al.* (1999).

recipientes de cultivo para evitar que se solidifique (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999). El esquema que resume estos principios básicos junto con las diferentes respuestas que pudieran aparecer, se presenta en la Figura 1.

1.1.2 Tipos de CTV

Existen varios tipos o métodos de CTV que varían en mayor o menor grado entre ellos, dependiendo de la tecnología y de los medios de cultivo utilizados. La figura 2 muestra los métodos teóricamente disponibles para la propagación de plantas *in vitro*. Esencialmente se realizan con la multiplicación de brotes a partir de las yemas axilares y por medio de la formación de brotes adventicios y/o embriones somáticos adventicios (George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999)

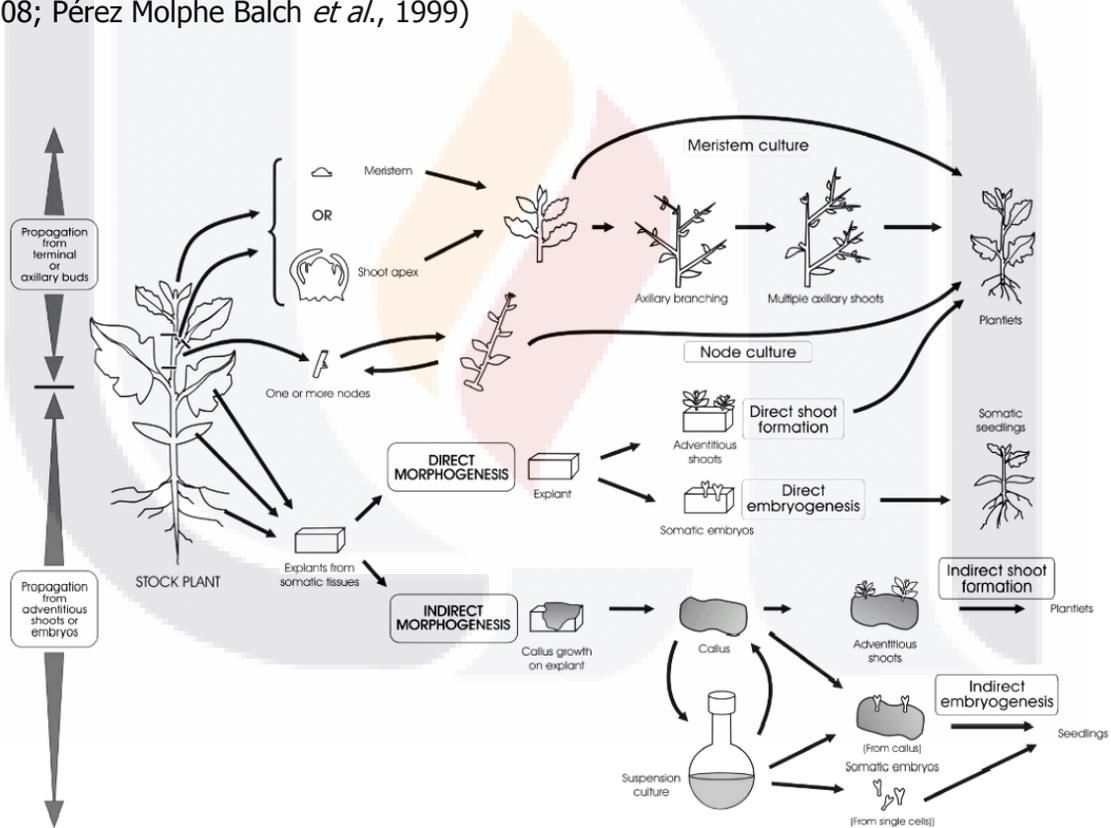


Figura 2. Principales métodos de micropropagación, modificado de George *et al.* (2008).

1.1.3 Radiación Fotosintéticamente Activa (RFA)

La RFA es la energía radiante que capturan los fotosistemas en las reacciones luminosas, usualmente dentro del rango de longitud de onda, que se ajusta mejor para que ocurra la fotosíntesis, de 400 a 700 nanómetros, de la luz visible, figura 3 (Thangadurai, 2007; Wetzzel, 2001).

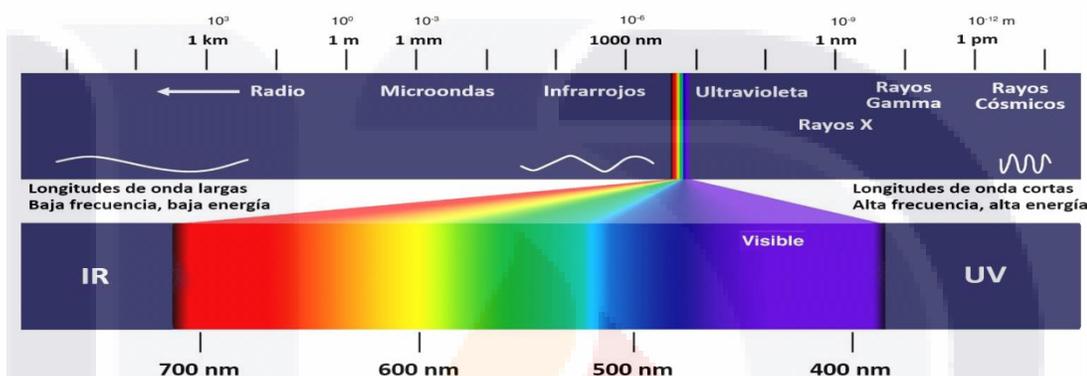


Figura 3. Espectro electromagnético donde se muestra la región de luz visible. Tomado de: <https://isqch.wordpress.com/2015/06/28/la-quimica-y-las-otras-luces-i/>

El nivel de la RFA que recibe un área es importante debido a que diferentes plantas responden a diferentes longitudes de onda. Todas las plantas reflejan las longitudes de onda verdes mientras que absorben el resto de la luz del espectro visible. Las plantas de sombra responden a menores niveles de RFA, realizando la fotosíntesis a un nivel de intensidad de radiación más baja. Sus hojas son más delgadas, largas y contienen menos moléculas de clorofila, facilitando así la fotosíntesis en condiciones de poca luz. Las plantas de sol recolectan RFA más eficientemente a altos niveles de luz, conforme la radiación solar (intensidad) aumenta las plantas de sol tienen una mayor tasa fotosintética. Sus hojas son pequeñas y gruesas con células especiales que permiten estas tasas más altas (LI-COR, 2014; University of Florida, 2011; Wetzzel, 2001).

Las lámparas fluorescentes se utilizan principalmente para dar las condiciones apropiadas de fotoperiodo y de luz a los explantes (aspecto importante en el crecimiento *in vitro* de las plantas) ya que los requerimientos de carbono por parte de la planta se encuentran satisfechos por los carbohidratos del medio de cultivo, reduciendo de esta manera la tasa

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fotosintética, pero el brillo insuficiente de estas lámparas y la luz de espectro pobre que producen, hace que los explantes deban de colocarse demasiado cerca de ellas (Sánchez *et al.*, 2009). Otra alternativa es someter los cultivos *in vitro* a la RFA para tratar de aumentar su tasa fotosintética y lograr de esta manera que se vuelvan autótrofos y estén mejor preparados para la aclimatación.

1.2 Composición del Medio de Cultivo

El éxito de un cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (crecimiento, desarrollo y la respuesta morfogénica) depende de la estructura genética del explante, del tipo de explante, el ambiente circundante y la composición del medio de cultivo. El último de estos parámetros es uno de los más sencillos de controlar o manipular, esto lo vuelve un punto importante a ser determinado experimentalmente y es recomendable probar una nueva combinación de componentes del medio para cada nuevo sistema (Bhojwani & Dantu, 2013; Endress, 1994; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Existen varias diferencias importantes en los tejidos cultivados *in vitro* con respecto a las que presenta una planta completa en condiciones normales (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999):

- Los tejidos vegetales cultivados *in vitro* no son autótrofos (salvo raras excepciones), dado que su tasa fotosintética se encuentra muy disminuida, esto quiere decir que no utilizan el CO₂ de la atmósfera como fuente de carbono para la síntesis de todos sus componentes. Esta es la razón de adicionar una fuente de carbono orgánico en el medio de cultivo. Aunque según menciona George *et al.*, (2008) la presencia de sacarosa en el medio inhibe específicamente la formación de clorofila y la fotosíntesis haciendo el crecimiento autótrofo menos factible.
- Se deben de adicionar al medio de cultivo, compuestos que en condiciones normales la planta es capaz de producir y que en condiciones *in vitro* ya no lo es.
- Las plantas *in vivo* realizan la adquisición de nutrientes por medio del órgano especializado para ello (la raíz). En los cultivos *in vitro* esta adquisición de nutrientes se realiza por medio de células no especializadas y con un área de

absorción mucho menor (excepto los cultivos celulares en suspensión) en comparación con una raíz con pelos radicales o en algunos casos con micorrizas

Existe una gran diversidad de medios de cultivo desarrollados principalmente de forma empírica, con pruebas de ensayo y error, porque se desconocen los requerimientos nutricionales precisos de las células vegetales cultivadas *in vitro* y porque estos requerimientos pueden variar entre diferentes especies vegetales o en diferentes estados de crecimiento de la misma especie. Algunos medios de cultivo son específicos, esto quiere decir que se adaptan a un solo tipo de tejido o a una determinada especie vegetal, mientras que otros son más generales, pueden ser aplicados con una amplia gama de especies y tejidos (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Actualmente los medios de cultivo más utilizados son el MS (Murashige y Skoog 1962), el LS (Linsmaier y Skoog 1965) y el medio B5 (Gamborg 1968). Estos medios se usan por lo general cuando el objetivo es la regeneración *in vitro* de plantas. Otros medio que también se utilizan frecuentemente con otros objetivos son el NN (Nitsch y Nitsch 1969) y el N6 (Chu 1978). Los medios WPM (Lloyd y McCown 1980) y DKW (Driver y Kuniyuki 1984) son frecuentemente usados en el cultivo de especies leñosas (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

La disponibilidad de los macro y micronutrientes en el medio de cultivo puede verse afectada por distintos factores como pueden ser la concentración y el tipo de gelificante usado, reacciones químicas que ocurren en el medio (pueden causar la precipitación de nutrientes), productos de la caramelización de carbohidratos (durante la esterilización) y la presencia de agentes quelantes en el medio. Los explantes pueden realizar una translocación inadecuada o toma insuficiente de nutrientes afectando la toma de los mismos (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

La clasificación de los principales compuestos en los medios de cultivo de tejidos vegetales, pueden variar, dependiendo del autor, pero generalmente contienen los siguientes grupos de sustancias: macronutrientes, micronutrientes, fuente de carbono,

vitaminas y otros elementos orgánicos (Collin & Edwards, 1998; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999):

1.2.1 Macronutrientes

Conocidos también como nutrientes vegetales primarios, macroelementos o elementos mayores. Se requieren en cantidades milimolares (mM). Los macroelementos o ingredientes esenciales de los medios de cultivos de tejidos vegetales son calcio (Ca^{2+}), potasio (K^+), magnesio (Mg^{2+}), nitrógeno (NO_3^-), azufre (SO_4^{2-}) y fósforo (PO_4^{3-}) (Bhojwani & Dantu, 2013).

Nitrógeno (N)

Es un elemento esencial que determina en gran medida la tasa de crecimiento del tejido. Su carencia se caracteriza por un amarillamiento de las hojas, principalmente las más viejas, y por un crecimiento reducido o nulo del tejido. En algunos tejidos, el amonio tiene un efecto benéfico, pero en otros puede resultar nocivo, sobre todo en concentraciones mayores a 8 mM. El suministro de nitrógeno puede complementarse con alguna fuente de nitrógeno orgánico, principalmente en forma de aminoácidos. Es suministrado al medio en forma de nitrato (NO_3^-) en concentraciones de 25-40 mM y/o de amonio (NH_4^+) en concentraciones de 2-20 mM. La proporción entre estas dos formas de nitrógeno es una variable importante a considerar cuando se experimenta con diferentes medios de cultivo. La mayoría de los medios de cultivo tienen entre 25 y 60 mM de nitrógeno inorgánico.

Fósforo (P)

Es un elemento vital en el desarrollo de la planta, pues se utiliza en la síntesis de ácidos nucleicos fosfolípidos y coenzimas. Funciona como un transmisor de energía por la vía del enlace pirofosfato del ATP. Los grupos fosfato unidos a diferentes azúcares proveen energía a la respiración y la fotosíntesis, además, los enlaces fosfato presentes en las proteínas regulan su actividad. Adicionado al medio en forma de fosfatos de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) o potasio (KH_2PO_4), en un rango que va de 1 a 3 mM. El fósforo es absorbido dentro de la planta como la forma primaria o secundaria de aniones ortofosfato

H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} y ya dentro es utilizado por las plantas en la forma totalmente oxidada PO_4^{3-} (George *et al.*, 2008).

Potasio (K)

Es necesario para la división celular normal, síntesis de carbohidratos y clorofila, asimilación de nitrógeno, extensión celular a través de la regulación de la turgencia, tiene funciones en el flujo de nutrientes a larga distancia y en los movimientos de los estomas, regula el pH y el ambiente osmótico dentro de las células. La carencia de este elemento origina un crecimiento débil y anormal, con pérdida del turgor celular, tejidos flácidos y un incremento en la susceptibilidad hacia la sequía, salinidad, daño por congelación y ataques por hongos. La deficiencia de potasio en medios de cultivo vegetales se dice que produce hiperhidricidad. Se puede administrar al medio de cultivo en forma de nitrato (KNO_3), fosfato (KH_2PO_4) o cloruro (KCl), dependiendo del medio de cultivo. Se utiliza en concentraciones de 20 a 30 mM (George *et al.*, 2008).

Calcio (Ca)

Participa como componente de las paredes celulares en forma de pectatos. Como el mayor catión, el calcio ayuda a balancear los aniones dentro de las plantas. Debido a su capacidad de unir moléculas biológicas junto con enlaces coordinados, el elemento está involucrado en la estructura y las propiedades biológicas de las membranas celulares y de la lamela media de las paredes celulares. Desempeña un papel importante en la regulación de innumerables procesos celulares debido a que varias enzimas son dependientes del calcio y el calcio es un cofactor de las enzimas responsables de la hidrólisis del ATP. Es adicionado al medio en forma de cloruro ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) o de nitrato ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en concentraciones de 1 a 3 mM (George *et al.*, 2008).

Magnesio (Mg)

Es el elemento central en la estructura de la porfirina, en las moléculas de clorofila y un importante cofactor enzimático, especialmente en aquellas enzimas involucradas en la transferencia de fosfatos. La síntesis de ATP requiere magnesio y es un elemento de unión en la agregación de las subunidades de los ribosomas. Sirve como catión balanceando y

neutralizando los aniones y los ácidos orgánicos. Se suministra al medio de cultivo vegetal en forma de sulfato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en concentraciones de 1-3 mM (George *et al.*, 2008).

Azufre (S)

Aunque el azufre es principalmente absorbido por las plantas en la forma oxidada (SO_4^{2-}), éste se incorpora en elementos químicos principalmente reducido, en grupos $-\text{SH}$, $-\text{S}-$, o $-\text{S}-\text{S}-$. El azufre se encuentra presente en las proteínas en forma de aminoácidos azufrados y constituyente de algunas vitaminas. Es utilizado por las plantas en la síntesis de lípidos y regula la estructura de las proteínas a través de la formación de puentes disulfuro $-\text{S}-\text{S}-$. El elemento también actúa como ligando uniendo iones de hierro, zinc y cobre a metaloproteínas y enzimas. Algunos compuestos azufrados importantes son el glutatión, que actúa como desintoxicador de los radicales del oxígeno, y las proteínas tioredoxina y ferredoxina involucradas en la química redox. La deficiencia de este elemento genera una disminución en la síntesis de proteínas, las plantas se vuelven rígidas, frágiles y de tallo débil. Generalmente suministrado al medio en forma de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) o de amonio, en concentraciones de 1 a 4 mM. Los sulfatos de manganeso, zinc, cobre y fierro suelen usarse como fuente de micronutrientes (George *et al.*, 2008).

1.2.2 Micronutrientes

Grupo de compuestos inorgánicos que generalmente se adicionan en concentraciones mucho menores, en comparación con los macronutrientes. Conocidos también como elementos traza, microelementos o elementos menores. Los micronutrientes generalmente incluyen al boro (BO_3^{3-}), manganeso (Mn^{2+}), hierro (Fe^{2+}), zinc (Zn^{2+}), cobre (Cu^{2+}), molibdeno (MoO_4^-), cobalto (Co^{2+}) y yodo (I) (Bhojwani & Dantu, 2013).

Manganeso (Mn)

Tiene propiedades similares al Mg^{2+} y aparentemente es capaz de remplazar al magnesio en algunos sistemas enzimáticos. El manganeso define la estructura de las metaloproteínas involucradas en la respiración y en la fotosíntesis, se requiere para la actividad de varias enzimas, lo que incluye descarboxilasas, deshidrogenasas, kinasas,

oxidasas y superóxido dismutasas. El manganeso se necesita para mantener la estructura de los cloroplastos, tienen un papel importante en las reacciones redox y en la evolución del oxígeno durante el fotosistema II del proceso fotosintético. Se suministra al medio de cultivo de 20 a 90 μM en forma de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008).

Zinc (Zn)

El zinc es componente de metaloenzimas estables, se necesita en más de 300 enzimas incluyendo alcohol deshidrogenasas, anhidrasas carbonicas, superóxido dismutasas y RNA polimerasas. Las plantas deficientes de zinc sufren de la reducción de la actividad enzimática con la consecuente disminución de la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y clorofilas. Además las plantas privadas de zinc desarrollan cloroplastos pobres, tienen internodos cortos y hojas pequeñas. Suministrado al medio en forma de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008).

Boro (B)

Está involucrado en la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática y de la pared celular. El elemento es necesario para el metabolismo de los ácidos fenólicos, para la biosíntesis de lignina y mantiene la actividad meristemática. Su deficiencia provoca que las plantas tengan sistemas radicales restringidos, se reduce la capacidad de absorber H_2PO_4^- y algunos otros iones, se disminuye la síntesis de citocininas. Uno de los cambios observados en las plantas que crecen con deficiencia de boro es la aparición de excrecencias de brotes laterales resultando en plantas con apariencia tupida o de roseta. El elemento es suministrado al medio de cultivo en concentraciones de 25 – 100 μM en forma de H_3BO_3 (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008).

Cobre (Cu)

El cobre se une a enzimas que a su vez se unen o reacción con el oxígeno. Estas incluyen la citocromo oxidasa y la superóxido dismutasa. Los átomos de cobre se encuentran en la plastocianina, un pigmento que participa en la transferencia de electrones. Varias enzimas dependientes del cobre están involucradas en la oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos lo que lleva a la construcción de importantes constituyentes poliméricos de las

plantas. Los medios de cultivo incluyen el cobre en rangos de 0.1 – 1.0 μM en forma de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008).

Molibdeno (Mo)

Es un componente de varias enzimas vegetales, como la nitrato reductasa y la nitrogenasa, en las cuales es un cofactor junto con el fierro: por lo que es esencial para la utilización del nitrógeno. Los tejidos y órganos en contacto con NO_3^- en medio deficiente de molibdeno pueden mostrar síntomas de toxicidad por nitratos ya que el ion no es reducido a amoníaco. Generalmente el molibdeno se utiliza en la concentración de 1.0 μM en $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008).

Cobalto (Co)

El cobalto es el componente metálico de la vitamina B12 relacionada con la síntesis de ácidos nucleicos, pero no se ha encontrado gran evidencia de su efecto estimulador en el crecimiento o morfogénesis de los tejidos vegetales. Una ventaja de adicionar cobalto al medio de cultivo vegetal, se puede deber al hecho de que el elemento tiene acción protectora contra la toxicidad de metales quelados y es capaz de inhibir las reacciones oxidativas catalizadas por los iones cobre y fierro. La concentración más utilizada en los medios de cultivo es de 0.1 μM en forma de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008).

Yodo (I)

El yodo no se reconoce como un elemento esencial para la nutrición de las plantas, aunque es necesario para el crecimiento de algunos tejidos vegetales. Se ha mencionado que la ausencia de yodo disminuye el crecimiento de las raíces. Pero algunas hipótesis mencionan que cualquier efecto benéfico del yodo se debe a la habilidad de sus iones para actuar como agentes reductores. Se suministra en el medio de cultivo en la cantidad de 5 μM de KI (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008).

Fierro (Fe)

En plantas, el fierro es utilizado en los cloroplastos, mitocondria y peroxisomas para efectuar reacciones de oxidación/reducción (redox). El elemento es requerido para la

formación del amino ácido laevulinico y del protoporfirinogeno (que son respectivamente, precursores tempranos y tardíos de la clorofila) y la deficiencia lleva a una marcada clorosis de las hojas. El fierro es componente también de las ferredoxinas, que funcionan como acarreadores de electrones en la fotosíntesis. El fierro suele ser el micronutriente más limitante debido a que tiende a precipitar al adicionarse en los medios de cultivo, por esta razón es que se suele suministrar de forma quelada con EDTA o en forma de citrato o tartrato, (estas últimas dos formas son poco empleadas). Generalmente se utiliza en la concentración de 1 mM en forma de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008).

Sodio (Na)

Los iones sodio (Na^+) son tomados dentro de las plantas, pero en muchos casos no son requeridos para el crecimiento y desarrollo de las mismas. El elemento puede funcionar como estabilizador osmótico en plantas halofíticas, estas pueden acumular grandes cantidades del ion Na^+ en las vacuolas para mantener el turgor suficiente para el crecimiento. El sodio sólo parece ser esencial en plantas tolerantes a la sal que tienen metabolismo C4. La mayoría de las formulaciones de macronutrientes no contienen sodio y las preparaciones de macronutrientes vegetales que contengan altas concentraciones de los iones sodio y cloro se considera que no están bien formuladas. En la mayoría de los medios, de forma indirecta, se agregan pequeñas cantidades de sodio por medio de las sales de los micronutrientes (George *et al.*, 2008).

1.2.3 Fuente de carbono

La fuente de carbono orgánico que normalmente se utiliza para los cultivos vegetales *in vitro* es la sacarosa, la concentración varía dependiendo de cada especie, se han probado otras fuentes de carbono (glucosa, fructosa, lactosa, galactosa, almidón, etc.), pero de manera general, ha dado mejores resultados la sacarosa. La sacarosa esterilizada con autoclave permite un mejor crecimiento de los tejidos que la sacarosa esterilizada por medio de filtración, ya que esterilizar con autoclave provoca la hidrólisis de la sacarosa en azúcares de uso más eficiente (glucosa y fructosa). El azúcar doméstica blanca y refinada es lo suficientemente pura para la mayoría de los propósitos prácticos. Cuando se altera la

concentración de la sacarosa o se prueban otras fuentes de carbono se debe de tener en mente que la sacarosa es el mayor regulador del potencial osmótico del medio de cultivo (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999). En algunos cultivos los gelificantes pueden utilizarse como fuente adicional de energía y carbono (Endress, 1994).

1.2.4 Otros elementos

Se ha observado que los tejidos vegetales cultivados *in vitro* pierden total o parcialmente la capacidad de sintetizar todas las vitaminas que necesitan y se vuelven dependientes del suministro externo. Se ha mencionado como benéfica la adición de algunos elementos orgánicos (piridoxina, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico, ácido ascórbico, ácido pantoténico, riboflavina, ácido p-aminobenzoico y el mio-inositol). Las vitaminas más ampliamente usadas son las del grupo B. De todas las vitaminas usadas en el cultivo de tejidos vegetales, sólo la tiamina y el mio-inositol se consideran ingredientes esenciales en los medios de cultivo de tejidos vegetales (Bhojwani & Dantu, 2013; Collin & Edwards, 1998). También se han realizado pruebas con ácidos orgánicos (citrato, malato, succinato y fumarato) pero sólo se observa un efecto benéfico de estos ácidos cuando se utiliza como fuente de nitrógeno el amonio, se piensa que los ácidos orgánicos pueden tener tres roles en los medios de cultivo: a) Pueden actuar como agentes quelantes, mejorando la disponibilidad de algunos micronutrientes, b) Pueden operar como buffers contra el cambio de pH en el medio y c) Pueden funcionar como nutrientes (George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Fuentes de N orgánico. Algunos medios de cultivo utilizan dos fuentes de N, una inorgánica y otra orgánica. Generalmente la fuente de N orgánico son los aminoácidos, que se usan de forma individual (glutamina, asparagina, y glicina) o en mezclas complejas (hidrolizados proteínicos, caseína). Algunos aminoácidos, en altas concentraciones, presentan un efecto inhibitorio en el crecimiento de ciertos tejidos, la treonina, glicina y valina inactivan la glutamato sintetasa reduciendo de esta manera el uso de amonio, se ha reportado que la arginina puede compensar esta inhibición (Collin & Edwards, 1998; Endress, 1994; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Complejos orgánicos. Conocidos también como suplementos no definidos, se utilizaron en los medios de cultivo vegetales tempranos. Su uso declino lentamente conforme el balance de sales inorgánicas fue mejorando y el efecto de los aminoácidos y las sustancias de crecimiento fue comprendido. En ocasiones se siguen utilizando cuando ninguna otra combinación de componentes definidos arrojan los resultados deseados. Los complejos orgánicos son productos naturales vegetales crudos formados de la mezcla de muchas sustancias (micronutrientes, fitohormonas, y sustancias no identificadas), que estimulan el crecimiento de los tejidos. Algunos complejos orgánicos utilizados son:

- Agua de coco.
- Extracto de malta.
- Jugo de tomate, de naranja y piña.
- Extracto de plátano.
- Extracto de levadura.
- Endospermo de maíz.
- Entre otros.

Se debe de evitar el uso de estos complejos debido a que se tiene poco control o conocimiento de sus componentes, y sus constituyentes activos pueden variar cualitativamente y cuantitativamente dependiendo de la edad y el genotipo de la planta, afectando la reproducibilidad de los resultados (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Gelificantes. Todos los medios semisólidos deben de contar con un gelificante, agente solidificante formado de polisacáridos, para tener la consistencia adecuada y mantener a los explantes en su lugar, para evitar que los explantes queden sumergidos en el medio lo que les provocaría condiciones de anaerobiosis. De preferencia los gelificantes deben de cumplir con las siguientes características: no ser reactivos (ser inertes), no digeribles por el tejido vegetal, soportar la esterilización por autoclave, ser resistentes a la hidrólisis enzimática y permanecer en estado líquido cuando están calientes, esto para que pueda ser vaciado en los recipientes de cultivo. Se pueden usar concentraciones desde el 0.2% hasta el 1%, la concentración determina la humedad disponible en el medio de cultivo ya que se unen de manera reversible al agua. Algunos gelificantes contienen altas cantidades de nutrientes minerales que dependiendo de la especie pueden afectar el crecimiento de los tejidos, en cuyo caso se deben de utilizar gelificantes de alta calidad. Otra alternativa para el soporte de los explantes, es el uso de puentes de papel filtro o poliuretano en

medio líquido. (Bhojwani & Dantu, 2013; Collin & Edwards, 1998; Endress, 1994; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

pH. Este parámetro es muy importante porque determina que sales se mantendrán en su forma soluble, influencia la toma de los ingredientes del medio y de los aditivos reguladores del crecimiento, tiene efecto en las reacciones químicas (especialmente las catalizadas por enzimas) y afecta el nivel de gelificación del agar. Valores menores a 5 provocan insuficiente gelificación, debido a la hidrólisis durante la esterilización y valores superiores a 6 inducen el endurecimiento evitando la difusión del agua y de los nutrientes; se debe de ajustar, entre 5.5 y 5.8, después de la adición y mezcla de los componentes para evitar variaciones posteriores. Generalmente se ajusta con KOH, NaOH y HCl al 1 ó 0.1 N. El pH puede variar de 0.3 a 0.5 unidades después de la esterilización por autoclave. Las variaciones se pueden evitar con el uso de estabilizadores de pH como es el caso del ácido 2-morfolino etanosulfónico (MES) (Bhojwani & Dantu, 2013; Endress, 1994; George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Reguladores del crecimiento. Son uno de los elementos más importante del medio de cultivo, porque determinan en gran medida el tipo de respuesta de los tejidos. Sus tipos y aplicaciones serán discutidas en la sección 1.3.

Otros elementos. Algunas células vegetales producen sustancias que provocan que ellas mismas se inhiban, para evitar esto se puede utilizar carbón activado, la polivinilpirrolidona (PVP) y la polivinilpolipirrolidona (PVPP). En caso de usar estos compuestos se debe de tener en cuenta que también adsorben cierta cantidad de algunos reguladores de crecimiento vegetal. En el cultivo *in vitro*, también existe la oxidación de los tejidos, para evitarla se puede utilizar ácido cítrico y/o ascórbico, cisteína y 8-hidroxiquinoleína. Se pueden adicionar otros compuestos a los medios de cultivo, dependiendo del estudio realizado, fungicidas y herbicidas para eliminar contaminaciones o para seleccionar tejidos resistentes en experimentos de transformación genética (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

1.3 Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)

Son compuestos químicos orgánicos cuya función es regulatoria, más que nutricional en el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. También se conocen como fitohormonas u hormonas vegetales, generalmente son activos a muy bajas concentraciones y tienen la capacidad de modificar el crecimiento vegetal. Los RCV muestran efectos muy significativos en la respuesta de los tejidos vegetales, porque determinan hasta cierto grado los patrones de desarrollo y los resultados obtenidos de los mismos. Los RCV que producen de forma natural los tejidos vegetales se denominan endógenos y los que se adicionan de forma externa exógenos. Son muy importantes en campos como la agricultura y el CTV por lo que deben de ser manejados apropiadamente y se recomienda tener en cuenta las siguientes observaciones (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999):

- La sensibilidad de los tejidos hacia los RCV exógenos, esto puede depender del estado fisiológico del tejido, de su origen y de los distintos receptores de membrana celular en cada uno de ellos.
- Generalmente las concentraciones de RCV que se utilizan *in vitro* son mayores a las concentraciones fisiológicas en los tejidos.
- El tipo de crecimiento y/o desarrollo que se necesita.
- La tasa de consumo y el transporte del RCV utilizado.
- La inactivación del RCV en el medio y dentro del explante.
- La interacción entre RCV endógenos y exógenos.

Debido a lo anterior algunos autores mencionan algunas recomendaciones para el uso de RCV en el CTV (Bhojwani & Dantu, 2013; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999):

- Realizar experimentos tomando los límites inferior, superior y un valor intermedio de las concentraciones recomendadas del RCV así se obtienen datos para otro experimento más exacto que permitirá determinar la concentración apropiada de RCV para dicho tejido vegetal.
- Para desarrollar un nuevo protocolo de cultivo de tejidos para nuevas especies de plantas, es necesario realizar experimentos con varios tipos y concentraciones de RCV en varias combinaciones y permutaciones.

- Las soluciones concentradas de RCV se preparan, pesando la cantidad indicada de RCV y disolviéndola en el menor volumen posible de solvente, cuando se haya disuelto se afora al volumen final con agua.
- Algunos RCV pueden perder una parte de su actividad debido al calor del proceso de esterilización (autoclave), las tablas 2, 3 y 4 indican los métodos de esterilización recomendados para cada RCV. En el caso de experimentos críticos o muy importantes se recomienda esterilizarlos por filtración a través de membranas Millipore. Una manera de evitar la pérdida de actividad (si se tiene que esterilizar en autoclave) es incrementando un poco la concentración del RCV en el medio.

La figura 4 muestra un resumen de los diferentes factores que influyen en la respuesta de un tejido cultivado *in vitro* a la adición de RCV exógenos. Como puede apreciarse, estos factores hacen que la respuesta del tejido a los RCV exógenos no sea simplemente proporcional a la cantidad que se añada al medio de cultivo.

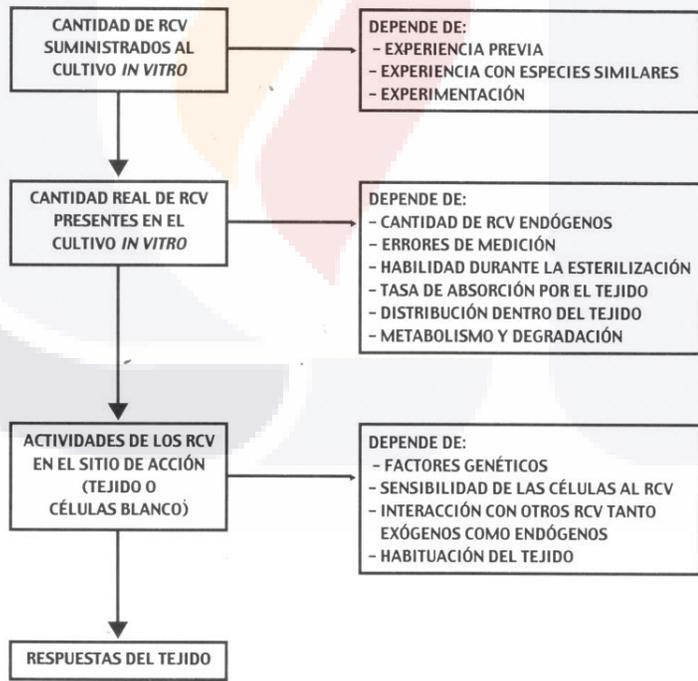


Figura 4. Resumen de los diferentes factores que influyen en la respuesta de un tejido cultivado *in vitro* a la adición de RCV exógenos, tomado de Pérez Molphe Balch *et al.* (1999).

La clasificación principal de los RCV se realiza en cinco grupos principales dependiendo de su estructura química y su efecto fisiológico que son: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Las auxinas y las citocininas son por mucho los componentes más importantes para regular el crecimiento y morfogénesis de los tejidos vegetales y de los cultivos de organos, por lo tanto son los RCV más utilizados en el cultivo *in vitro*; en estas clases, se han descubierto reguladores sintéticos con la misma actividad biológica que igualan o exceden a las sustancias naturales. Actualmente no existen opciones sintéticas para las giberelinas y el ácido abscísico (George *et al.*, 2008). El balance entre auxinas y citocininas suele ser determinante en los resultados obtenidos; la figura 5 muestra las respuestas que se pueden obtener de este balance, pero siempre se debe de tener en cuenta que pueden aparecer ciertas variaciones entre especies y tejidos (Endress, 1994; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

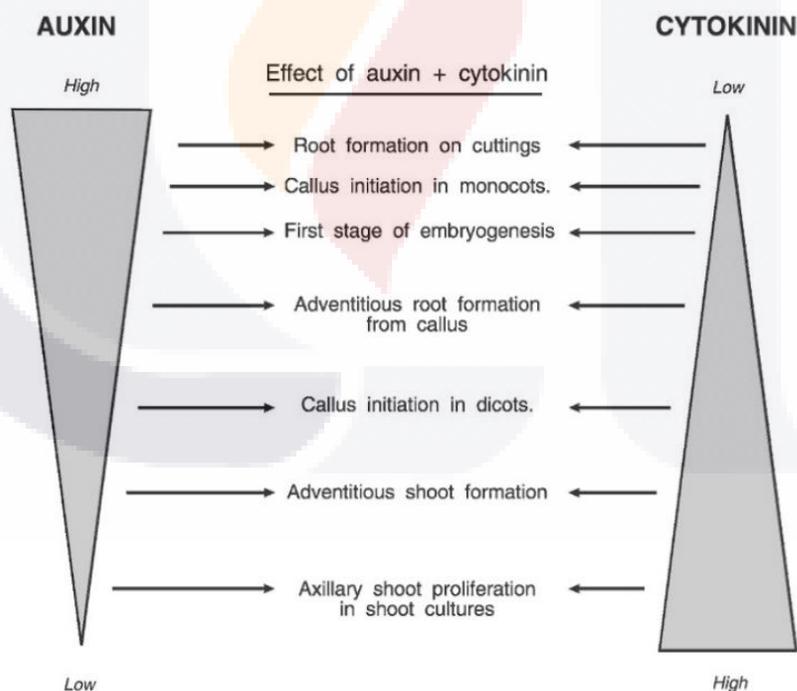


Figura 5. Concentraciones relativas de auxinas y citocininas requeridas para generar distintas respuestas en el cultivo *in vitro* (crecimiento y morfogénesis), tomado de George *et al.* (2008).

1.3.1 Auxinas

La palabra auxina proviene del Griego *auxein* que significa alargar o crecer. Las auxinas generalmente se derivan del triptófano y son sintetizadas en los ápices. Las distintas auxinas varían en su fuerza o actividad. En cultivos *in vitro* participan en el crecimiento celular, la acidificación de la pared celular, el inicio de la división celular, la formación de tejidos no diferenciados, la diferenciación del tejido vascular y la formación de órganos como los meristemas. En las plantas completas afectan la dominancia apical, el enraizamiento, la elongación de tallos y entrenudos, la senescencia, la abscisión de las hojas y coordinan algunas respuestas trópicas. (Bhojwani & Dantu, 2013; Endress, 1994; George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Las auxinas comúnmente utilizadas en el cultivo de tejidos son el ácido indolacético (AIA), el ácido indolbutírico (AIB), el ácido naftalenacético (ANA), el Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y el ácido para-clorofenoxiacético (p-CPA). El AIA y el AIB por ser auxinas naturales tienden a ser metabolizados rápidamente por los tejidos, lo que afecta su disponibilidad, la cual va disminuyendo progresivamente. Esta característica es útil para procesos que necesitan altas concentraciones de auxinas al inicio de los mismos. Las auxinas sintéticas (ácidos fenoxiacéticos) suelen ser más activas y duran más tiempo en el cultivo *in vitro*, ya que los tejidos vegetales carecen de la maquinaria enzimática necesaria para degradarlas (Bhojwani & Dantu, 2013; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Tabla 1. Ejemplos de auxinas más utilizadas en el CTV.

Nombre	Nombre común	PM	Conc. usada (mg/L)	Solvente	Esterilización	Fuente
Ácido indolacético	AIA (IAA)	175.2	0.01-3	NaOH 1N	• Autoclave • Filtración	Natural
Ácido naftalenacético	ANA (NAA)	186.2	0.10-10	NaOH 1N	• Autoclave	Sintética
Ácido indolbutírico	AIB (IBA)	203.2	0.10-10	NaOH 1N	• Autoclave • Filtración	Natural
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,4-D	221.0	0.01-5	NaOH 1N Etanol	• Autoclave	Sintética
Ácido amino-tricloropicolínico	Picloram	241.5	0.10-10	DMSO	• Autoclave	Sintética

Modificado de Pérez Molphe Balch *et al.* (1999).

1.3.2 Citocininas

Las citocininas se definen por su capacidad para promover la división y crecimiento celular *in vitro* de tejidos callosos (Endress, 1994). Las citocininas naturales generalmente son derivados de adenina N⁶-sustituida y se presentan en las plantas como nucleosidos y nucleótidos. Generalmente se derivan de la adenina y se sintetizan en tejidos jóvenes y raíces. Tienen la capacidad de estimular la síntesis de proteínas, participan en el control del ciclo celular estimulando y regulando la división celular y rompen la latencia de las yemas axilares, modificando la dominancia apical y la diferenciación de los brotes. En plantas completas, promueven la brotación de yemas axilares, estimulan la expansión de las hojas y retardan la senescencia (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Tabla 2. Ejemplos de citocininas más usadas en el CTV.

Nombre	Nombre común	PM	Conc. usada (mg/L)	Solvente	Esterilización	Fuente
Benciladenina	BA	225.3	0.1-10	NaOH 1N	• Autoclave • Filtración	Sintética
Cinetina	CIN	215.2	0.1-10	NaOH 1N	• Autoclave • Filtración	Sintética
Isopentiladenina	2iP	203.2	1.0-30	NaOH 1N	• Autoclave • Filtración	Natural
Feniltiazol urea	Tidiazurón (TDZ)	220.2	0.001-0.1	DMSO	• Autoclave • Filtración	Sintética

Modificado de Pérez Molphe Balch *et al.* (1999).

Otros RCV también tienen aplicaciones en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Bhojwani & Dantu, 2013; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999):

- Ácido giberélico se utiliza en la elongación de estructuras (brotes e internodos), para acelerar la brotación en ciertos tipos de yemas y meristemos y se le atribuye el desarrollo normal de plántulas obtenidas de brotes adventicios. Es altamente soluble en agua fría y muy sensible a la esterilización por calor.
- Ácido abscísico, se usa por lo general como inhibidor de crecimiento natural, para impedir la germinación de embriones somáticos o en algunos casos para completar el proceso de maduración de los mismos.
- Etileno es una hormona gaseosa vegetal que se produce por el envejecimiento y el estrés en los tejidos, se cree que influye en la embriogénesis y la organogénesis y que puede ser promotor o inhibidor de algunos procesos en diferentes sistemas vegetales.

Tabla 3. Ejemplos de otros reguladores del crecimiento y sustancias afines utilizadas en el CTV.

Nombre	Nombre común	PM	Conc. usada (mg/L)	Solvente	Esterilización	Fuente
Ácido abscísico	ABA	264.3	0.1-10	NaOH 1N	• Autoclave • Filtración	Natural
Acido 3,6-dicloroanísico	Dicamba	221.0	0.1-10	Etanol	• Filtración	Sintética
Ácido giberélico	GA ₃	346.4	0.01-5	Etanol	• Autoclave • Filtración	Natural
Ácido jasmónico	---	210.3	0.01-100	Etanol	• Filtración	Natural
Fosfometil glicina	Glifosato	169.1	---	NaOH 1N	• Filtración	Sintética

Modificado de Pérez Molphe Balch *et al.* (1999).

1.4 Micropropagación

La propagación clonal de plantas fue originalmente desarrollada como una herramienta de investigación para estudiar la fisiología y la bioquímica de las plantas. Pero se observó que la técnica tenía un alto potencial comercial, se le llamo micropropagación debido a la miniaturización del proceso, la micropropagación fue la primera técnica en utilizarse con fines económicos y actualmente es una tecnología industrial ampliamente utilizada alrededor del mundo (Bhojwani & Dantu, 2013; Scragg, 1995). Se le llama micropropagación a la propagación asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*. La micropropagación es la técnica más aplicada debido a su enorme productividad comparada con las técnicas tradicionales y se basa en la producción de tejidos estériles, la estimulación de la regeneración de tejido vegetal, el rápido crecimiento de las plántulas jóvenes, enraizamiento de las plántulas y su adaptación en condiciones normales de suelo (Collin & Edwards, 1998; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

1.4.1 Ventajas y desventajas

Las principales ventajas que ofrece la micropropagación son las siguientes (Bhojwani & Dantu, 2013; Collin & Edwards, 1998; Endress, 1994; George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999):

- Se conservan todas las características genotípicas del material vegetal inicial seleccionado, ya que es un sistema de clones. Se recomienda elegir variedades con características sobresalientes.
- Los cultivos pueden iniciarse con partes muy pequeñas de las plantas.
- Se pueden producir plantas difíciles de propagar y de cualquier parte del mundo.
- El proceso es independiente de las condiciones externas (factores ambientales y eventos sociales) porque se realiza en ambientes controlados.
- La tasa de multiplicación *in vitro* es mucho más rápida que los métodos *in vivo*.
- La producción puede basarse en la demanda ya que se puede obtener un número ilimitado de plantas, el límite lo determina la capacidad del laboratorio.
- El espacio que necesita un laboratorio de este tipo es mínimo por lo que se reduce el uso de tierra agrícola.
- El material vegetal necesita poca atención entre subcultivos.
- Este método permite obtener plantas libres de bacterias, hongos y nematodos fitopatógenos, e incluso libres de virus y viroides, por lo que se consideran de mejor calidad.
- Existen menos impedimentos fitosanitarios para enviarse a otros países.
- Se pueden adaptar procesos automáticos de producción.
- El material reproducido vegetativamente puede almacenarse por largos periodos.
- La producción *in vitro* puede planearse almacenando los cultivos a bajas temperaturas en las temporadas que el mercado ofrece poca demanda.

Las principales desventajas que tiene la micropropagación son (Collin & Edwards, 1998; George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999):

- Alto costo inicial del laboratorio.
- Las plantas inicialmente obtenidas son pequeñas y algunas veces con características indeseables.

- Debe prevenirse la contaminación o el daño de las plantas madre.
- Las plantas derivadas de estos cultivos inicialmente no pueden producir sus propios requerimientos de materia orgánica, por medio de la fotosíntesis, por lo que sufren de un periodo de transición antes de que sean capaces de un crecimiento independiente.
- Se suelen necesitar largos periodos para el enraizamiento y aclimatación de las plantas.
- Se requiere de personal altamente capacitado.
- En caso de querer introducir nuevas especies, se necesitan largos periodos de investigación y desarrollo para establecer las condiciones de cultivo.

1.4.2 Etapas básicas

La micropropagación de cualquier especie vegetal consta de cinco etapas básicas y todas son importantes para el éxito del sistema. Los pasos que son descritos aquí son como guía general y no deben de ser aplicados tan rígidamente.

Etapas 0. Selección de las plantas madre

Antes de iniciar con la micropropagación se debe de tener especial atención en la selección y acondicionamiento de las plantas madre que se utilizaran para iniciar los cultivos *in vitro*. Deben ser plantas típicas de la variedad o especie a trabajar y estar libres de cualquier síntoma de enfermedad. En algunas ocasiones se requieren procedimientos para detectar y reducir o eliminar enfermedades bacterianas sistémicas y enfermedades por virus. Se suelen aplicar pretratamientos ya sea para disminuir la probabilidad de contaminación (tratamiento periódico con fungicidas, poda severa, colocar el material vegetal en un ambiente más higiénico, etc.), o para favorecer el establecimiento de los cultivos *in vitro* (temperatura, iluminación, fotoperiodo, fertilización o aplicación de RCV) (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Etapa 1. Establecimiento de los cultivos axénicos

Aquí se debe de obtener un cultivo aséptico del material vegetal seleccionado y la selección del explante para establecer dicho cultivo dependerá de la especie y del sistema de proliferación a aplicar en la Etapa 2:

- Para la propagación por yemas o meristemos, los explantes iniciales generalmente se toman de individuos adultos.
- Para la organogénesis el tipo de explante pueden ser segmentos de hoja, tallo o tejidos juveniles.
- Para la embriogénesis somática, los explantes son tejidos nucelares y embriones sexuales inmaduros.

Un lote de explantes es transferido al medio de cultivo al mismo tiempo y después de un corto periodo de incubación se descartan todos los contenedores que presenten explantes o medio contaminado. El éxito de esta etapa depende de la correcta elección del explante, el procedimiento adecuado de esterilización y la prevención de cualquier reacción de hipersensibilidad de los explantes. Generalmente el establecimiento de los tejidos es muy bajo debido a los problemas de adaptación y contaminación pero, esta etapa se considera satisfactoria si un número adecuado de explantes han sobrevivido sin contaminación y siguen creciendo. El objetivo es la reproducibilidad, no el éxito al 100% ya que no se requiere mucho material para iniciar la Etapa 2 (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Etapa 2. Multiplicación o producción de propágulos viables

El éxito del protocolo de micropropagación depende enormemente de la eficacia de esta etapa. El objetivo de esta etapa es obtener una gran cantidad de material vegetal, brotes pequeños o propágulos, que cuando son separados del cultivo pueden originar plantas completas, en algunos casos con raíz y con poca probabilidad de adaptarse a las condiciones ambientales externas. Algunos de los brotes producidos en esta etapa pueden utilizarse como base para ciclos de multiplicación adicionales en los cuales pueden ser cultivados de nuevo (subcultivados) para aumentar su número. Las tres vías para la multiplicación *in vitro* son: la organogénesis, la embriogénesis somática y la multiplicación por yemas, ápices o meristemos. Los dos primeros sistemas pueden ser más rápidos y/o productivos, pero también son más susceptibles a la variación genética, lo que afecta un

esquema de propagación clonal (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Etapa 3. Elongación y enraizamiento

En esta etapa se espera que los brotes formen raíces y aumenten su tamaño para hacer más probable su adaptación al ambiente externo. La formación de raíces o enraizamiento es muy variable y en general depende de la especie vegetal, algunas especies requieren de RCV como auxinas, otras solo con medio MS y algunas más con carbón activado. La etapa de enraizamiento representa alrededor del 70% del costo de las plantas micropropagadas, por lo que el porcentaje de enraizamiento debe ser mayor al 95%. En cultivos basados en brotes adventicios o axilares, esta etapa se puede dividir en: Etapa 3a, que consiste en la elongación de los brotes obtenidos de la etapa 2 y Etapa 3b, enraizamiento de los brotes de la etapa 3a. Para ahorrar en costos y reducir el tiempo, otra alternativa es el enraizamiento *in vivo*, figura 6, transfiriendo los brotes generados en la etapa anterior directamente al sustrato con previa generación de micro esquejes, aplicación de un enraizador comercial en la base de los brotes o una solución de auxinas y manteniendo el ambiente con alta humedad relativa. Es de esperarse que se incremente la mortalidad, pero se evita una etapa completa de la micropropagación, por lo que debe analizarse la conveniencia del enraizamiento *in vivo* para cada especie. El enraizamiento *in vivo* presenta varias ventajas (Bhojwani & Dantu, 2013; Collin & Edwards, 1998; George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999):

- Las raíces generadas *in vitro* mueren y se deben desarrollar nuevas raíces para sostener la planta, lo que incrementa el riesgo de infección.
- La conexión vascular entre las raíces generadas *in vitro* y el brote no debe estar bien desarrollada.
- Las raíces formadas *in vitro* carecen de pelos radicales lo que las hace menos eficaces cuando son transplantadas.
- El proceso de transplante puede dañar a las raíces, además es difícil remover el agar de las raíces sin dañarlas.
- Se evita el problema de la generación de tejido calloso en la unión de las raíces y del brote.

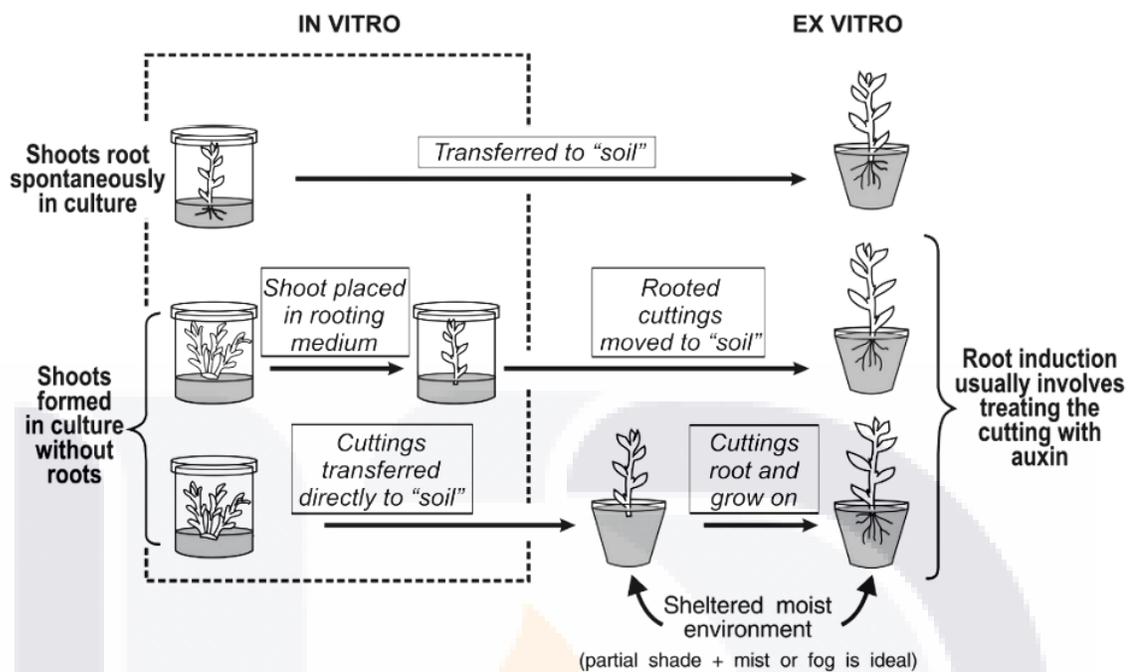


Figura 6. Métodos alternativos de enraizamiento de brotes micropropagados, modificado de George *et al.* (2008).

Etapas 4. Trasplante y aclimatación

Los métodos por los cuales las plántulas se transfieren del ambiente *in vitro* al *ex vitro* son muy importantes, para evitar una pérdida significativa de material vegetal. Existen varias razones por las cuales el material vegetal desarrollado *in vitro*, difícilmente se adapta al medio externo (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999):

- Los brotes generados en los cultivos se han producido en un ambiente de alta humedad y baja intensidad luminosa, lo que provoca varias alteraciones en las plantas como son: que las hojas presenten menos cera epicuticular o que la cera esté alterada en su composición química, existe poca diferenciación del tejido mesófilo y los estomas de las hojas son atípicos o incapaces de cerrarse totalmente. Por estas razones los cultivos de tejidos vegetales pierden agua rápidamente cuando se colocan en las condiciones externas, por lo que el proceso de adaptación al ambiente externo debe ser lo más gradual posible, con una reducción lenta de la humedad relativa.
- Durante el cultivo *in vitro* las plantas no realizan una fotosíntesis normal y sus necesidades de carbono son satisfechos por el medio. La anatomía de las hojas

difiere de la de las plantas que crecen *in vivo*, cloroplastos poco desarrollados con bajo contenido de clorofila y grana desorganizada. Al parecer se necesita de un estímulo, que no se provee en el ambiente *in vitro*, para que las plantas sean totalmente capaces de producir sus propios requerimientos de carbono. El paso de las plantas generadas *in vitro* hacia la autotrofia debe ser gradual, y deberán ser lo suficientemente vigorosas para soportarlo.

- Las plantas *in vitro* no han desarrollado mecanismos de resistencia contra microorganismos nocivos. Se recomienda trabajar bajo las condiciones más asépticas posibles y eliminar cualquier resto de medio de cultivo de las raíces de la planta por que puede favorecer contaminaciones.

En la práctica, las plantas son retiradas de sus contenedores de cultivo, se les retira totalmente y con cuidado el medio de cultivo de las raíces, las plantas se colocan en el sustrato y se mantienen por varios días con alta humedad relativa, ya sea de forma manual o automática. La aparición de hojas nuevas después de que la planta se transfirió al sustrato es un indicador de que la adaptación es exitosa. Es aquí cuando se recomienda reducir la humedad relativa e incrementar la luz (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

1.4.3 Propagación por medio de yemas, ápices y meristemos

La generación de plantas por medio de este método ha demostrado ser de confianza para la propagación clonal *in vitro*. Usualmente se utilizan dos métodos: a) el cultivo de brotes y b) el cultivo de nodos sencillos o múltiples, figura 7. La mayoría de las células de las plantas no continúan dividiéndose, el crecimiento de las plantas se debe a los meristemos o tejidos meristemáticos. Los cuales se localizan únicamente en ciertas zonas o puntos de crecimiento de la planta (ápices, axilas, ápices de la raíz, zona del cambium y felógeno). La propagación por medio de esta técnica se basa en la capacidad de estos tejidos de seguir dividiéndose, capacidad que se aprovecha para la generación de nuevos brotes o plántulas, ya que cuando se establecen y cultivan *in vitro* mantienen esta capacidad natural. Esta técnica es menos compleja y no conlleva fenómenos de desdiferenciación y

rediferenciación celular. Los brotes así obtenidos pueden enraizarse y producir nuevas plantas (George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999; Taiz & Zeiger, 2002).

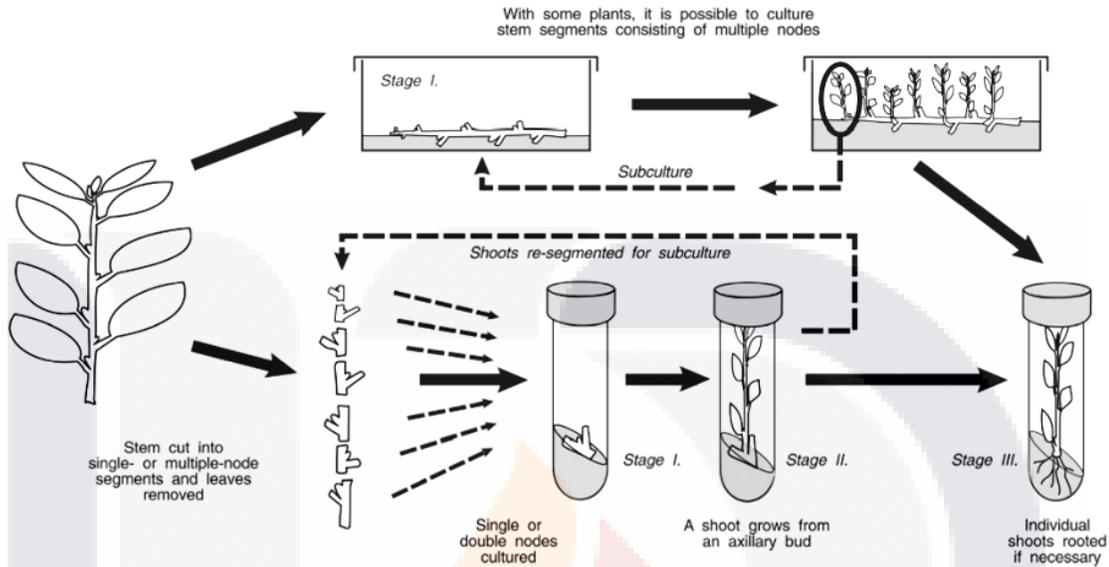


Figura 7. Cultivo de nodos sencillos y múltiples, modificado de George *et al.* (2008).

Los explantes primarios, de la primera etapa de los subcultivos, pueden derivarse de meristemos o de los brotes apicales o laterales de una planta intacta y consisten en un ápice del tallo meristemático, con el tallo rudimentario subtendido con varias hojas iniciales figura 8; la separación de los brotes axilares para enraizamiento o para subcultivos, es más sencilla en especies que de forma natural producen brotes largos. El medio de cultivo para este tipo de propagación es relativamente sencillo, el medio para el crecimiento de nodos es intrínsecamente igual al medio para cultivo de brotes y sólo el medio para el cultivo de meristemos es un poco más complicado. Agregar algunas citocininas, favorece la brotación múltiple (de una yema se obtienen varios brotes). Se recomienda que la yema se encuentre cerca o en contacto con el medio de cultivo para acelerar la respuesta (George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

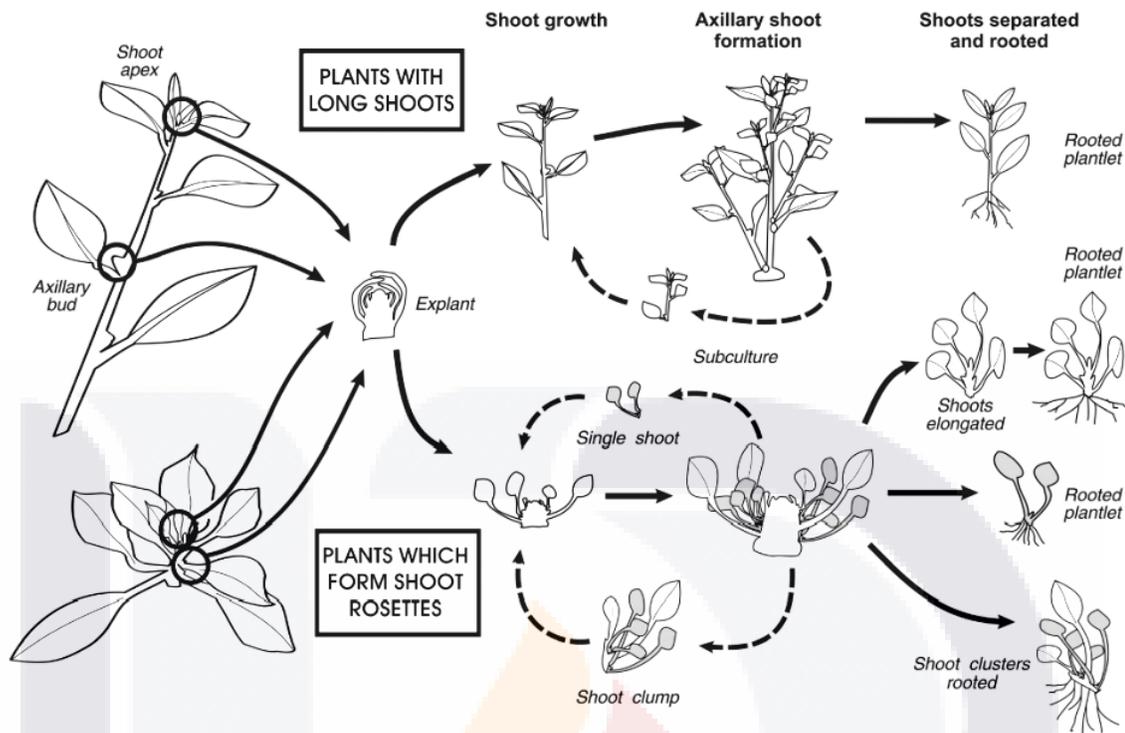


Figura 8. Cultivo de puntas apicales, modificado de George *et al.* (2008).

De manera general, el cultivo de tejidos meristemáticos se puede dividir en cuatro tipos básicos: a) cultivo de meristemas, b) cultivo de yemas axilares, c) cultivo de ápices y d) microinjerto *in vitro*. Y dado que en este trabajo se utiliza el cultivo de yemas axilares y de ápices serán de los que se hablará un poco más.

Cultivo de yemas axilares

Es el método más sencillo en la micropropagación de plantas, el tamaño del explante no es determinante, sólo se requiere que éste lleve una o más yemas axilares, a partir de las cuales se dará la producción de brotes (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Cultivo de ápices

Aquí se deben de tener explantes apicales de cierta longitud (4-10 mm), que contienen al meristemo, varios primordios foliares y tejido vascular diferenciado. Al manejarse explantes de mayor tamaño se aumenta la probabilidad de supervivencia y se vuelve un método más sencillo de trabajar, pero no es recomendable para obtener plantas libres de patógenos. Las plantas son propagadas dividiendo y recultivando los brotes individuales o

los racimos de brotes, ambos pueden pasarse al tratamiento de enraizamiento para generar plantas completas que se pueden aclimatar (George *et al.*, 2008; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

Ventajas, desventajas y características de esta técnica (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999):

- Es un sistema ideal para la propagación clonal, porque ofrece la máxima estabilidad genética.
- Sistema relativamente sencillo y muy similar en todas las especies, lo que disminuye la experimentación necesaria. Pero es más lenta y menos productiva que la organogénesis y la embriogénesis somática.
- Este sistema combinado con termoterapia o quimioterapia, permite la obtención de plantas libres de patógenos.
- Ideal para la conservación *in vitro* de germoplasma, por medio de crecimiento retardado o criopreservación.
- Una desventaja es la alta sensibilidad de los tejidos a los métodos de esterilización superficial
- Las plantas leñosas producen altas cantidades de compuestos fenólicos.
- En algunos casos se presenta la vitrificación de algunas especies.
- No es recomendable para la obtención de plantas transformadas genéticamente por los métodos convencionales.

1.5 Biorreactores

Mientras que la micropropagación tiene varias ventajas sobre las técnicas de propagación convencionales para clonar diversos materiales vegetales seleccionados, puede ser impredecible y una tecnología de producción costosa. Algunas desventajas de las técnicas actuales es que requieren un gran número de pequeños contenedores, medio semisólido, división manual aséptica de los tejidos vegetales y la transferencia periódica del material vegetal a medio fresco (debido al desgaste de los nutrientes o por el crecimiento de los tejidos). El tiempo entre subcultivos varía dependiendo de la especie. La mano de obra generalmente cuesta del 40-85% del coste de producción. Siendo cortar y plantar la parte más cara de la técnica. También se debe de tener en cuenta la limpieza y el manejo de un

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

gran número de contenedores. Otros costos resultan de las pérdidas durante la aclimatación y la hiperhidricidad de raíces y brotes. Además se ha reportado la evidencia de estrés oxidativo, en algunas especies, durante la micropropagación (Aragón *et al.*, 2010; Brown & Thorpe, 1995; Etienne & Berthouly, 2002; Gupta & Timmis, 2005; Paek *et al.*, 2001; Vasil, 1994).

El medio líquido es ideal para la micropropagación porque reduce los costes de la producción de plántulas, reduce las operaciones manuales y permite su automatización; la automatización y el escalamiento de los cultivos líquidos son esenciales para superar algunas de las limitaciones impuestas por los métodos que requieren mucha mano de obra y los altos costos de producción. El medio líquido provee condiciones de cultivo más uniformes con una adecuada transferencia de oxígeno, es fácilmente renovado sin tener que cambiar de contenedor durante las diferentes fases de cultivo de manera que los cultivos pueden tener los nutrientes correctos en el momento adecuado; la esterilización se realiza por microfiltración y la limpieza del contenedor después de un periodo de cultivo es más sencilla; en comparación con el medio semisólido, se pueden utilizar contenedores más grandes; los tiempos de transferencia pueden ser reducidos, así como los riesgos de contaminación. Los tejidos vegetales de numerosas especies han presentado mayor tasa de crecimiento, utilizando medio líquido en lugar de medio semisólido (Etienne & Berthouly, 2002; Gupta & Timmis, 2005; Mamun *et al.*, 2015; Ziv, 2005). Las ventajas del cultivo *in vitro* en medio líquido son contrapesadas por problemas técnicos como la asfixia, la hiperhidricidad de hojas y tallos, el esfuerzo cortante, anomalías morfológicas, y la necesidad de equipos más complejos; para compensar estos problemas se han desarrollado otros sistemas de cultivo como el uso de distintos soportes para el material vegetal, agregar medio líquido a cultivos establecidos en agar y la implementación de distintos tipos de biorreactores ya que es imposible elegir un solo tipo de biorreactor para cultivar tejidos vegetales y órganos para todos los propósitos. (Etienne & Berthouly, 2002; Georgiev *et al.*, 2013; Mamun *et al.*, 2015).

Muchos de los métodos *in vitro* utilizados para la propagación de plantas o propágulos han demostrado ser más efectivos cuando se realizan utilizando biorreactores. Los biorreactores son sistemas controlados, cerrados y estériles, en los que se monitorean las

condiciones internas por medio de diferentes sensores dependiendo del objetivo del cultivo; la función principal de los biorreactores es crear el ambiente óptimo de crecimiento para la especie seleccionada regulando los factores físicos y/o químicos (Mamun *et al.*, 2015; Paek *et al.*, 2001; Paek *et al.*, 2005). El crecimiento y desarrollo de las células vegetales *in vitro* principalmente dependen del metabolismo celular junto con las características del perfil de flujo y la transferencia de masa. La mejor estrategia de operación en biorreactores es la que genera una alta productividad volumétrica, pero por regla general los cultivos vegetales reducen su productividad al momento de escalar el proceso (Georgiev *et al.*, 2013; Mamun *et al.*, 2015; Weathers *et al.*, 2010). La productividad de cualquier proceso, (medido como g de producto / L de cultivo / día), es uno de los más importantes parámetros operativos y se aplica para cultivos microbianos y de tejidos vegetales. Para poder asegurar una alta productividad de un proceso económicamente rentable, se debe de sumar la tasa de crecimiento, el rendimiento y la concentración de biomasa (Scragg, 1995).

Los biorreactores para el cultivo de tejidos vegetales suelen ser económicos y de fácil escalamiento en el campo de la agricultura (Miao *et al.*, 2008). Existen muchos diseños de biorreactores dependiendo del tejido vegetal utilizado, de la escala y del factor económico deseado para cada producto ya que los requerimientos fisiológicos de algunos tejidos vegetales pueden ser incompatibles con los diseños generales de los biorreactores (Curtis, 2005).

1.5.1 Tipos de Biorreactores en el CTV

Los biorreactores utilizados para la propagación clonal y la producción de metabolitos se pueden dividir en tres amplias categorías dependiendo del método de agitación y del tipo de contenedor (Georgiev *et al.*, 2013; Mamun *et al.*, 2015; Paek *et al.*, 2005):

- *Biorreactores operados de forma mecánica:* de tanque agitado, de tambor rotatorio y de filtro giratorio.
- *Biorreactores operados neumáticamente:* de columna de burbujas, biorreactor de burbujas de tipo balón, de transporte aéreo y de inmersión temporal. El biorreactor

de inmersión temporal se analizará más a fondo ya que es el que se utilizó en este proyecto.

- Otros biorreactores: de difusión, de perfusión, de lecho fluidizado estabilizado magnéticamente, reactores de células vegetales inmovilizadas, biorreactores desechables, de membrana, de flujo, de placa oscilatoria, de nutrientes ultrasónicos en niebla.

1.5.2 Sistemas de Inmersión Temporal

Los sistemas de inmersión temporal han demostrado efectos positivos en todas las etapas de la proliferación de brotes en muchas especies vegetales, los índices de proliferación son generalmente mejores que los obtenidos en medio semisólido o en biorreactores convencionales. Además de que las plántulas regeneradas tienen mejor calidad y han demostrado buenos índices de sobrevivencia y vigor en la fase de la aclimatación (Etienne & Berthouly, 2002).

Los sistemas de inmersión temporal o biorreactores de inmersión temporal, pueden ser máquinas basculantes o equipos neumáticos que combinan dos características importantes:

- Ventilación de los tejidos vegetales, lo que permite el intercambio máximo de gases.
- Contacto intermitente entre la superficie completa del tejido y el medio líquido, incrementando la velocidad de la toma de los nutrientes y el reemplazo de los mismos, que se encuentran en la superficie de las células vegetales.

Por estas razones concentraciones menores de nutrientes son usualmente las óptimas, comparadas con las que se utilizan en medio semisólido. Los inhibidores de crecimiento exudados por los tejidos vegetales, como los compuestos fenólicos, son rápidamente diluidos a niveles inocuos. Las principales ventajas radican en que estos sistemas limitan los niveles de cizalla y evitan una inmersión permanente en el medio líquido, lo que impide la hiperhidricidad reduciendo así las anomalías morfológicas de los tejidos (Etienne & Berthouly, 2002; Gupta & Timmis, 2005; Mamun *et al.*, 2015).

Las características que comparten estos sistemas son: se pueden utilizar contenedores de mayor tamaño que los recipientes de cultivo convencionales, son transparentes, son esterilizables, los sistemas son más sencillos de usar que los biorreactores convencionales, los periodos de subcultivo pueden ser mayores, permiten el contacto total o parcial del medio líquido y de los explantes y el contacto puede ser programable. Los diseños de los sistemas son muy variables y existen (Etienne & Berthouly, 2002):

- Sistemas con máquinas basculantes o balancines.
- Sistemas de inmersión completa con mecanismo de renovación de medio.
- Sistemas de inmersión parcial con mecanismo de renovación de medio.
- Sistemas de inmersión completa impulsados neumáticamente, sin renovación de medio.

Al ser el sistema que se utilizó, en este proyecto nos enfocaremos en los últimos mencionados.

Sistemas de inmersión completa impulsado neumáticamente, sin renovación de medio. – existen dos sistemas de este tipo; el Sistema de Recipientes de Inmersión Temporal Automatizado (RITA[®], figura 9D) y el Sistema de Frascos Gemelos (BIT[®], figura 9E).

El sistema RITA[®] consiste en un recipiente de 1 L dividido en dos secciones, la superior contienen las plántulas y la inferior el medio de cultivo. La sobrepresión aplicada en el compartimento inferior empuja el medio hacia la parte superior. Las plantas son sumergidas tanto como la presión sea aplicada. Durante el periodo de inmersión, aire es burbujeado a través del medio, agitando suavemente los tejidos y renovando la atmósfera del espacio superior dentro de la cámara de cultivo, con la sobrepresión escapando a través de tubos de salida en la parte superior del aparato. Los recipientes RITA[®] se encuentran bien configurados para ofrecer condiciones de lenta desecación. La humedad relativa en el compartimento superior puede ser controlada por el tipo de solución salina saturada colocada en el compartimento inferior.

El sistema BIT[®] consiste en dos frascos de vidrio o plástico conectados (250 mL - 10 L), a los que se les aplica sobrepresión de forma alternada para empujar el medio al otro recipiente (Etienne & Berthouly, 2002).

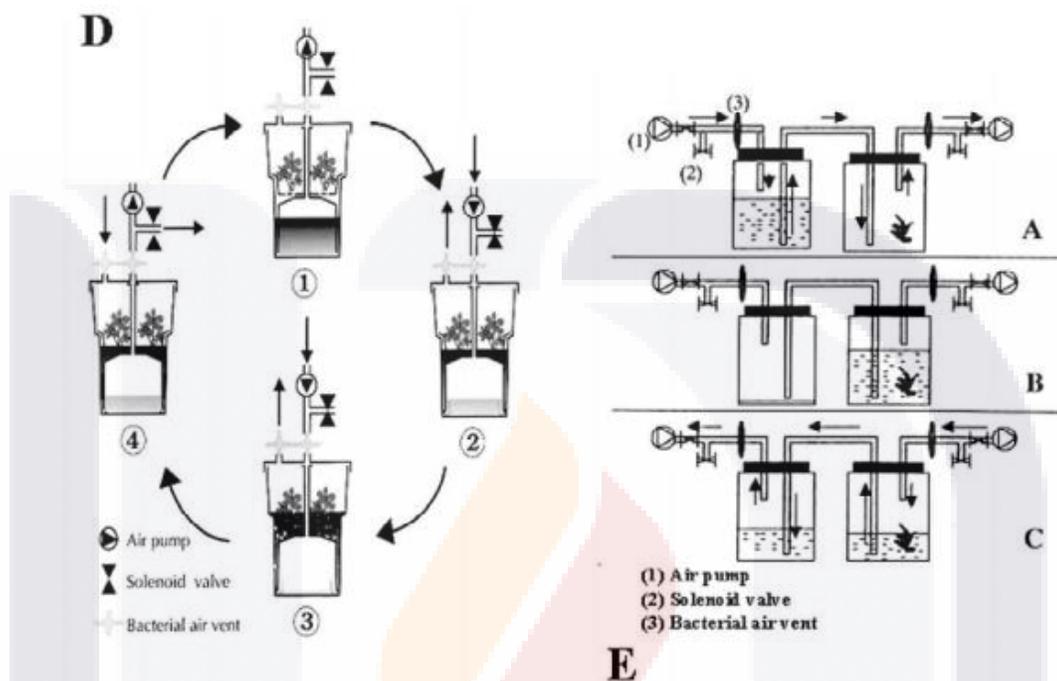


Figura 9. Representación diagramática de algunos sistemas de inmersión temporal semiautomáticos: Sistemas (D y E) con inmersión completa del material vegetal transfiriendo el medio de forma neumática y sin renovación del medio, modificado de Etienne & Berthouly (2002).

Los parámetros de cultivo que afectan la eficacia de los sistemas de inmersión temporal son (Etienne & Berthouly, 2002):

- **Tiempo de inmersión** – varían dependiendo de la especie, del proceso y del sistema usado. El tiempo de inmersión determina la toma de nutrientes y el control de la hiperhidricidad.
- **Volumen de medio líquido** – grandes volúmenes han probado ser menos eficientes.
- **Volumen del contenedor del cultivo** – probablemente el mayor tamaño de los contenedores permite un mayor crecimiento de los tejidos vegetales.
- **Aereación ó ventilación forzada** – estos sistemas causan una ventilación forzada que provoca la renovación total de la atmósfera de cultivo. Estas

condiciones estimulan la transpiración de las plantas, lo que las puede volver más adaptadas para las condiciones *ex vitro*.

La composición de la fase gaseosa depende del volumen del recipiente, del volumen de medio y de la ventilación o flujo del gas, condiciones fácilmente manipulables. Los requerimientos gaseosos pueden variar entre especies y la concentración pueden ser regulada por la agitación o el mezclado y a través de la aereación, el flujo de gas y el tamaño de las burbujas (Ziv, 2005).

La automatización del proceso de propagación, resultará en una reducción drástica de la mano de obra, lo que implicara no solo en la reducción de los costos, sino también en la producción ilimitada del número de plantas abriendo el mercado a muchos vegetales, frutas y especies de árboles. Para que sea atractivo el costo debe de estar entre 0.01 – 0.05 US\$ por unidad (Vasil, 1994). Existen dos obstáculos principales en esta área, el primero es la ausencia de un sistema de monitoreo del proceso en línea para las células vegetales y el segundo es la heterogeneidad e inestabilidad de las células (Zhong *et al.*, 1995). Se han desarrollado varias estrategias para la automatización de la micropropagación, en Japón dependen de la ayuda robótica y del análisis computarizado de imágenes de los brotes y en Israel han desarrollado el proceso Vitromático (Vasil, 1994).

Las técnicas de modelado convencional, para el crecimiento y la productividad final de los cultivos vegetales *in vitro*, algunas veces son ineficaces debido a la complejidad de los patrones de desarrollo característicos (no deterministas y no lineales) de los sistemas biológicos, para minimizar estos problemas se han desarrollado sistemas que utilizan redes neuronales artificiales (ANN), que mediante el reconocimiento de patrones de crecimiento del tejido inoculado y la estimación de la biomasa, han demostrado ser útiles en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Mehrotra *et al.*, 2008). La micropropagación automatizada basada en biorreactores debe ser el método elegido para la propagación masiva de plantas ya que se pueden desarrollar sistemas similares de producción (Vasil, 1994).

1.6 Generalidades de la especie *Capparis spinosa*

1.6.1 Descripción botánica (morfología), origen y distribución



Figura 10. Dibujo morfológico de *Capparis spinosa* L., tomado de Lansky *et al.* (2014).

El alcaparro (*Capparis spinosa*), (figura 10), es la especie tipo del género, es un arbusto espinoso perenne dicotiledóneo de 20 a 100 cm de alto con un sistema de raíces gruesas y muy profundas (6-10 m de longitud). Las hojas se encuentran alternadas, 2-5 cm de longitud de forma ovalada o elíptica, con la base redondeada y mucronada, con el ápice obtuso o marginado. La aparición de los brotes de las flores es continua, de modo que pueden ser observadas en todas las etapas del desarrollo, de brotes a flores. Las flores son principalmente nocturnas, tienen un tamaño de 5 a 7 cm transversalmente, se encuentran de forma axilar y solitaria, con sépalos de color morado y pétalos de color blanco; pierden completamente su turgencia dentro del periodo de 12-16 h; su abscisión y secreción del néctar es dependiente de la temperatura. El fruto

(alcaparrón) es elipsoide, con un pericarpio delgado; la temporada de fructificación inicia en mayo y termina a principios de julio. Las frutas se abren cuando maduran, liberando las semillas de la pulpa de color carmesí pálido. Las semillas tienen de 3 a 4 mm de tamaño y son reniformes (con forma de riñón), figura 11. El alcaparro pertenece al género *Capparis* y a la familia Capparaceae. Se cree que existen alrededor de 250 a 350 especies dentro del género *Capparis* L. (Al-Safadi & Elias, 2011; Carra *et al.*, 2012b; Gull *et al.*,

2015; Tlili *et al.*, 2011), aunque otros autores mencionan la existencia de sólo 80 especies (Jiang *et al.*, 2007).

El alcaparro es conocido por varios nombres por ejemplo *Caper* (inglés), *Kabbar* (árabe), Alcaparro (español) y *Gollaro* (pakistán). Es nativa de la cuenca mediterránea, se encuentra ampliamente distribuida en el viejo mundo; en el Sur de Europa, Norte y Este de África, Madagascar, Suroeste y Centro de Asia, hasta Australia y Oceanía (Figura 12) (Carra *et al.*, 2012a; Jiang *et al.*, 2007; Tlili *et al.*, 2011).

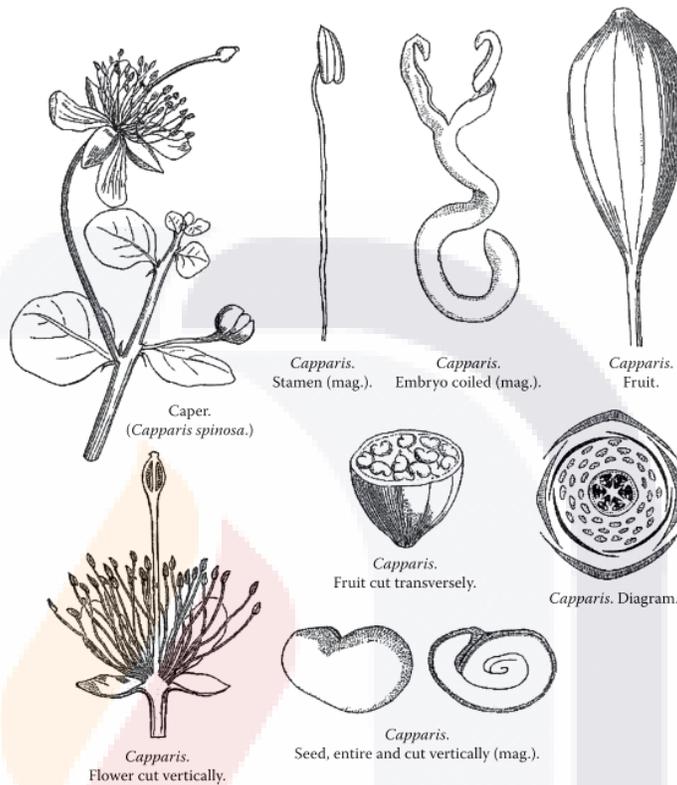


Figura 11. Morfología de diferentes órganos de la alcaparra, tomado de Lansky *et al.* (2014).

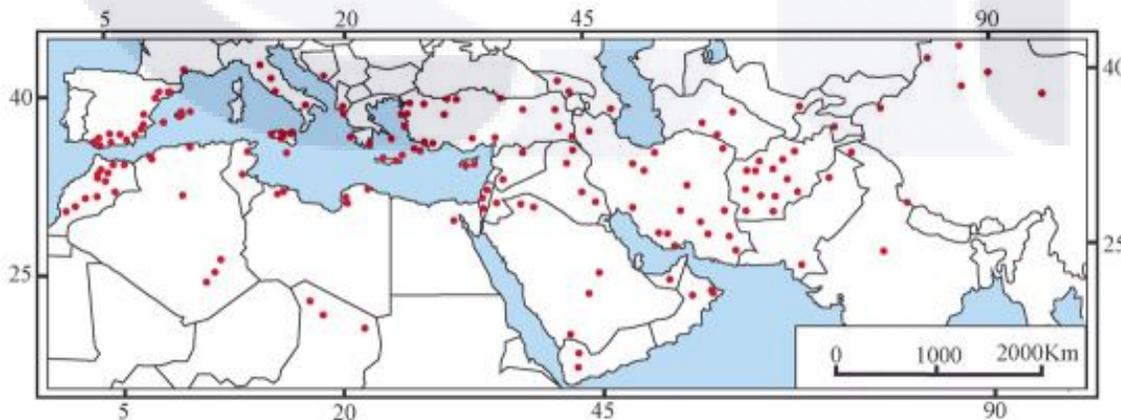


Figura 12. Distribución natural del alcaparro en Eurasia y el Norte de África, tomado de Jiang *et al.* (2007).

1.6.2 Condición ambiental y cultivo

De forma silvestre la alcaparra puede crecer en las grietas y hendiduras de las rocas y paredes de piedra, en suelos arenosos con pocos nutrientes o en el suelo rocoso de algunas islas de esta zona, incluyendo alfisoles, regosoles y litosoles (Bhoyar *et al.*, 2010; Farhoudi & Makezadeh, 2013; Tlili *et al.*, 2011). Las plantas comienzan a crecer a inicios de mayo, (época de lluvia), y se marchitan para finales de septiembre, (inicio del clima frío). Por lo que la planta crece y florea completamente en el verano (Rhizopoulou, 1990; Tlili *et al.*, 2011). La planta es resistente a ciertas concentraciones de sal, a la sequía y a cambios de pH entre el rango de 6.1 a 8.5, prefiriendo el calor seco, la luz solar intensa y puede resistir temperaturas extremas desde los -40°C hasta superiores a los 40°C, ha desarrollado mecanismos que reducen el impacto de las altas radiaciones y temperaturas, y no parece mostrar estrés hídrico o ningún síntoma de foto-inhibición (Bhoyar *et al.*, 2010; Farhoudi & Makezadeh, 2013; Khalil *et al.*, 2012; Tlili *et al.*, 2011).

El área más importante de la producción se encuentra tradicionalmente en los países del Sur de Europa (Italia, España y Grecia), donde la alcaparra se cultiva por medio de sistemas tradicionales, así como en huertos comerciales, pero requiere de un buen sistema de drenaje. Recientemente esta especie ha tenido una amplia distribución en diferentes áreas, se ha registrado sobre todo en el norte de África (Algeria, Túnez, Marruecos y Egipto) y Oriente Medio (Siria, Turquía e Irán) donde, de acuerdo a sus diferentes usos, en los últimos años ha sido objeto del interés comercial (Carra *et al.*, 2012a; Tlili *et al.*, 2011).

A pesar de su importancia económica y ecológica, sólo unos pocos estudios se han dedicado a la propagación de *C. spinosa*, casi todas las investigaciones se han enfocado en sus propiedades medicinales. Cierta información arqueobotánica y fuentes de literatura antigua trazan el uso del alcaparro (semillas, hojas y raíces) para propósitos medicinales y cosméticos, desde la antigua Grecia (Musallam *et al.*, 2011). Aunque la relación entre las alcaparras y los seres humanos puede remontarse hasta la Edad de Piedra, ya que se han desenterrado restos de *Capparis spinosa* en sitios arqueológicos del Mesolítico menor (9500-9000 B.P.) (Jiang *et al.*, 2007). La importancia actual de la producción de alcaparra

está relacionada con su uso en la industria alimentaria, así como en la medicina, los cosméticos, el área farmacéutica y más recientemente como arbusto ornamental para prevenir la erosión del suelo en áreas descuidadas (Carra *et al.*, 2012a; Farhoudi & Makezadeh, 2013; Khalil *et al.*, 2012). Las partes del alcaparro con valor comercial para la industria de alimentos son los botones de flores inmaduras que son curtidos en vinagre o preservados en sal granular; las frutas semi-maduras (bayas de alcaparro) y los brotes jóvenes con hojas pequeñas se colocan en escabeche para usarse como condimento; los extractos de la alcaparra y su pulpa se han utilizado también en cosméticos, (Al-Safadi & Elias, 2011; Bhojar *et al.*, 2010; Hessam *et al.*, 2012; Musallam *et al.*, 2011).



Figura 13. Imágenes de distintos órganos del alcaparro. a) Flor de *Capparis spinosa* L., b) Frutos verdes inmaduros y c) Fruto abierto *in situ* (alcaparrón). (Imágenes a) y b) tomadas de Lansky *et al.* (2014)), (Imagen c) tomada de: es.wikipedia.org).

1.6.3 Etnofarmacología

La etnofarmacología se refiere al estudio científico de sustancias de uso medicinal, especialmente remedios tradicionales, por diferentes grupos culturales o étnicos. La tabla 4 muestra un resumen de los usos principales de *Capparis spinosa* por diferentes grupos étnicos.

Tabla 4. Usos tradicionales actuales del alcaparro alrededor del mundo.

Usuarios	Aplicaciones principales	Referencias
Árabes antiguos	Curar hemorroides, disipar malos olores y gases, enfermedades renales, del hígado y de la piel, diabetes.	Al-antaki, 1935; Ibn, 1877
Antiguos romanos y griegos	Limpiar úlceras, dientes adoloridos, protección contra el dolor de la parálisis y el bazo.	Rivera <i>et al.</i> , 2003
Egipcios antiguos	Matar gusanos de los oídos, podredumbre de dientes y encías, problemas estomacales, acelerar la menstruación, picadura de escorpión, obstrucción en el hígado, despertar el apetito, enfermedades renales.	Ducros, 1930; Rivera <i>et al.</i> , 2003
Árabes de Israel	Cura de la tos, reumatismo, diabetes, enfermedades del pulmón, sordera, enfermedad nerviosa, calmar dolores, tratar heridas abiertas, limpieza del tracto respiratorio, para incrementar la erección, tratar la infertilidad en hombres y mujeres.	Palevitech <i>et al.</i> , 1985
Beduinos Bischarin	Consumida como comida, curar la fiebre y dolor de cabeza.	Goodman & Hobbs, 1988
Beduinos Sinai	Curar dolores musculares y reducir la fiebre.	Osborn, 1968; Levey, 1978
Egipto	Adicionada al vino para evitar que se deteriore, usada también como condimento.	Renfrew, 1987
Regiones de Marruecos	Curar la diabetes.	Jonad <i>et al.</i> , 2001; Eddouks <i>et al.</i> , 2002
Hawaii	Reparar huesos rotos.	Nagata, 1971
India	Laxante, tónico, expectorante, antihelmíntico, emenagogo, analgésico; bueno para tratar reumatismo, parálisis, dolor de muelas,	Ducros, 1930; Kiritikar & Basu, 1987

	agrandamiento del bazo, glándulas tuberculosas, matar gusanos del oído, infecciones conjuntas, diurético, mordeduras de víbora y dolor de oídos.	
Irán	Golpes en cabeza, malaria e infecciones conjuntas.	Hooper, 1937
Judíos y población de Iraq	Curar enfermedades de la piel, expectorante, diurético, estimulante, potenciador de medicinas y se usa en el tratamiento del escorbuto.	Al-Rawi & Chakravarty, 1964; Ben-Ya'akov, 1992
Israel	Para extraer sanguijuelas de las gargantas de los seres humanos y ovejas.	Dafni, 1984
Somalia	Tratamiento de la tos.	Thulin, 1993
Uigurs de China	Curar úlceras de la piel, enfermedades del bazo, reumatismo, parálisis, enfermedades conjuntas, parálisis facial, tumefacción del ganglio linfático, tiña versicolor, eccemas, alejar los mocos, calmar dolores, gota, hombros congelados, queloide, soriasis.	Anonymous, 1977; Luo & Xie, 1999; Ren, 2002; Li <i>et al.</i> , 2004a; Li <i>et al.</i> , 2004b; Anonymous, 2005a,b

Modificado de Jiang *et al.* (2007) y Tili *et al.* (2011).

1.6.4 Fitoquímica

Los análisis cuantitativos y cualitativos de los fitoquímicos de alguna planta en particular definen sus atributos biológicos, nutricionales y farmacéuticos (Gull *et al.*, 2015). El Centro Internacional para la Investigación de la Agricultura en Zonas Áridas (ICARDA), considera al alcaparro como una planta medicinal (Musallam *et al.*, 2011). Varios estudios bioquímicos han reportado la presencia de varios constituyentes químicos activos, como lo son alcaloides, lípidos, flavonoides y glucosinolatos, que muestran un papel muy importante en varias de las actividades farmacológicas incluyendo antialérgicos, antiinflamatorios y antioxidantes, además de contener cantidades sustanciales del antioxidante rutina biflavonoide, tabla 5 (Bhojar *et al.*, 2010; Musallam *et al.*, 2011).

Tabla 5. Constituyentes químicos en diferentes partes de la especie *Capparis spinosa*.

Partes	Constituyentes químicos
Semillas	<i>Esteroles</i> (stigmasterol, sitosterol, campesterol y avenasterol). <i>Tocoferoles</i> (como la vitamina E) en las isoformas α -, γ -, y δ -tocoferol. <i>Carotenoides</i> (luteína y β -caroteno). <i>Alcoholes alifáticos y triterpénicos</i> (hexadecanol, octadecanol, tetracosanol, β -amirina, gramisterol, cicloartanol y citrostadienol). <i>Glucosinolatos</i> (glucocapperin y 2-hydroxyethyl glucosinolate), quercetina y 3-O-gentiobioside.
Raíces	Alcaloide espermidina, isocodonocarpina, capparisinina, capparidisina, capparina, capparinina, cadabacina-26-O- β -D-glucósido y capparispina-26-O- β -D-glucósido.
Tallos	Glucósidos flavonoide y agliconas flavonoles.
Hojas	Compuestos de amonio cuaternario, fenólicos, alcaloides, kaempferol, quercetina, isorhamnetina, glucósidos flavonoides, agliconas flavonoles, tocoferoles (α - y γ -tocoferol), carotenoides, ácido p-Metoxy benzoico, n-triacontano, n-pentacosano y thomnocitrina.
Brotes	Compuestos fenólicos, glucosinolatos (glucocapperina), flavonoides, quercetina, glucósidos de kaempferol, n-triacontano y n-pentacosano.
Yemas	Glucosinolatos (glucocapperina), tocoferoles (α - y γ -tocoferol) y carotenoides.
Flores	Tocoferoles (α - y γ -tocoferol), carotenoides, n-triacontano y n-pentacosano.
Frutos	Isocodonocarpina, β -sitosterol, guanosina, capparina A, capparina B, prenylglucosido, capparilosido A, nucleósido adenosina (stachydrin), hipoxantina, uracilo, apigenina, kaempferol, isoginkgetina, ginkgetina, sakuranetina, ácido cinámico, ácido p-hydroxybenzoico, ácido protocatechurico, ácido vanílico, n-triacontano, n-pentacosano, β -caroteno, ácido ascórbico, ácido fítico, ácido oxálico, flazina, guanosina, 1H-indol-3-carboxaldehido, 4-hidroxi-1H-indol-3-carboxaldehido, chrysoeriol, thevetiaflavona, 5-hidroximetilfuraldehido, β -sitosterol, daucosterol, uracilo, ácido butanedioico yuridina.

(Gull *et al.*, 2015; Tlili *et al.*, 2011).

1.6.5 Actividades Biológicas

Se ha reportado que la alcaparra posee algunas propiedades medicinales y actividad antioxidante (Tlili *et al.*, 2011). Se dice que el alcaparro reduce las flatulencias y que tiene efectos antirreumáticos. Se ha reportado como estimulador y protector hepático, mejora la función del hígado y es útil en el tratamiento de la arterioesclerosis, como diurético, desinfectante del riñón, vermífugo y tónico. En adición a todo esto, las infusiones y decocciones de la corteza de la raíz del alcaparro se han utilizado de manera tradicional para la hidropesía, anemia, artritis y gota; ver tabla 6 (Al-Safadi & Elias, 2011; Hessam *et al.*, 2012).

Tabla 6. Actividades biológicas de diferentes extractos de plantas de alcaparro.

Extracto/Parte	Actividad	Referencias
Acuoso/ <i>C. spinosa</i>	Disminuye la biosíntesis de colesterol.	Eddouks <i>et al.</i> , 2005
Acuoso/Raíces	Purgativo, antihelmíntico y hepatoprotectivo.	Ali <i>et al.</i> , 2009; Gaind <i>et al.</i> , 1969; Mali & Mehta, 2008
Alcohólico/Corteza de raíz	Antibacterial y antifúngico.	Gaind <i>et al.</i> , 1969; Mali <i>et al.</i> , 2004
Alcohólico/Pulpa de la fruta	Antihelmíntico.	Gaind <i>et al.</i> , 1969; Mali <i>et al.</i> , 2004; Mali & Mehta, 2008
Etanólico/ <i>C. spinosa</i>	Inhibe la proliferación de fibroblastos y la producción de colágeno tipo I en la esclerosis sistémica.	Cao <i>et al.</i> , 2008
Etanólico/Frutas	Anti-arterioesclerótica, antihipertensiva, antiinflamatoria, analgésico, antiasmático y antihiperlipidémico.	Chahlia, 2009; Ghulam, 2002; Mishra <i>et al.</i> , 2013; Purohit & Vyas, 2006; Sharma <i>et al.</i> , 1991; Yadav <i>et al.</i> , 1997
Éter de petróleo, cloroformo y metanólicos/ <i>C. spinosa</i>	Antimicrobial y hepatoprotectivo.	Ali <i>et al.</i> , 2009
Metanólico/Brotes	Inmunoestimulante.	Arena <i>et al.</i> , 2008
Metanólico/ <i>C. spinosa</i>	Muestra un efecto antioxidante significativo.	Bonina <i>et al.</i> , 2002; Germano <i>et al.</i> , 2002

Modificado de Gull *et al.* (2015).

1.7 Antecedentes sobre el cultivo *in vitro* de *Capparis spp.*

Desde el punto de vista agronómico, existen varios aspectos que deben evaluarse cuidadosamente para poder mejorar el rendimiento, la calidad y superar las limitaciones de la producción en masa de las plantas de alcaparro. Estos aspectos son la baja tasa de

germinación de sus semillas, la dificultad de propagación (Carra *et al.*, 2012a; Hessam *et al.*, 2012) y la eficiencia de enraizamiento de sus esquejes vegetativos, debido a que las variedades, los clones y el periodo de corte (primavera, verano u otoño), afectan el éxito del enraizamiento (Chalak & Elbitar, 2006; Khalil *et al.*, 2012).

1.7.1 Ruptura de la dormancia

El método tradicional de propagación del alcaparro es por medio de semillas, pero estas presentan un alto flujo genético, lo que provoca tener variantes genéticas respecto a los hábitos de crecimiento, rendimiento, calidad de la flor-brotes y el comportamiento vegetativo (Carra *et al.*, 2012a). Las semillas de alcaparras frescas germinan fácilmente, pero en un porcentaje bajo (1-2%) (Bhoyar *et al.*, 2010; Khalil *et al.*, 2012), debido a la dormancia fisiológica y a la dormancia física (cubierta de la semilla) que provoca que el mucilago se desarrolle cuando la semilla se coloca en contacto con el agua e impone una barrera efectiva en contra de la difusión del oxígeno hacia el embrión (Al-Safadi & Elias, 2011; Bhoyar *et al.*, 2010), por todo esto la producción de plantas a partir de semillas no es muy eficaz, además de que el secado de semillas induce inactividad, dormancia o latencia severa, que es difícil de superar de forma natural (Hessam *et al.*, 2012).

En los casos de dormancia se requieren de tratamientos especiales para romperla, (Tabla 7). Estos tratamientos pueden ser químicos o mecánicos (Carra *et al.*, 2012b). Se han reportado tratamientos enfocados en reblandecer o romper la testa dura de las semillas utilizando ácidos, agua caliente, acetona, alcohol, nitrato de potasio o incluso tratamientos físicos como el raspado de las semillas. Algunos otros tratamientos utilizan reguladores del crecimiento vegetal. Los que muestran mejores resultados son los que someten las semillas a escarificación con H_2SO_4 , sumergen las semillas en GA_3 o aplican combinaciones de ambos (Al-Safadi & Elias, 2011; Bhoyar *et al.*, 2010; Khalil *et al.*, 2009; Sozzi & Chiesa, 1995); otros tratamientos utilizan KNO_3 solo o en combinación con lo antes mencionado (Hessam *et al.*, 2012). Se ha encontrado que el uso del ácido salicílico incrementa significativamente la germinación y el crecimiento de las plántulas en *C. spinosa* bajo estrés por sequía; también el ácido giberélico tiende a incrementar la germinación en todos los tratamientos estudiados en comparación con el control. De acuerdo al estudio

(Heydariyan *et al.*, 2014), el cebado con ácido salicílico comparado con otros ácidos tiene un mayor impacto en la germinación de alcaparra bajo condiciones de estrés por sequía y la combinación de GA₃ con la lixiviación incrementa la germinación arriba del 30%, mostrando que la lixiviación disminuye la formación de mucilago alrededor de las semillas y que la germinación se incrementa sólo cuando GA₃ se combina con la lixiviación. Los resultados de Farhoudi & Makezadeh (2013) indican que la escarificación no mejora la germinación de las semillas de alcaparro. Por otro lado Al-Safadi & Elias (2011) afirman que fueron capaces de germinar semillas de alcaparra latente en sólo 2 semanas, después del cultivo en medio nutritivo *in vitro* después de la irradiación de la semilla con bajas dosis de rayos gamma, sin la necesidad de un tratamiento ácido o rayar la cubierta de la semilla. De hecho, se obtuvo 50% de germinación de semillas 4 semanas después de la irradiación de semillas con 100 Gy y el cultivo *in vitro*. Además, se obtuvo alrededor del 70% de germinación cuando las semillas irradiadas se plantaron en Peatmoss® en lugar de medio MS.

El método de cebado o primado regula la temperatura y el contenido de humedad y tiene como objetivo incrementar la germinación en condiciones de estrés para maximizar el potencial de germinación (Heydariyan *et al.*, 2014).

Tabla 7. Resumen de los diferentes tratamientos utilizados para detener la dormancia de las semillas.

Germinación (%)	Tratamientos	Referencias
47	Tratamiento de semillas de alcaparro con ácido sulfúrico durante 20 min combinados con el raspado de la semilla.	Al-Safadi & Elias, 2011
32	Semillas tratadas solamente con ácido sulfúrico.	Al-Safadi & Elias, 2011
20	Semillas solamente raspadas sin tratamiento ácido.	Al-Safadi & Elias, 2011
33	Remojar las semillas por 40 min en H ₂ SO ₄ concentrado.	Bhoyar <i>et al.</i> , 2010

61	Pre remojar semillas en H ₂ SO ₄ concentrado por 20 min seguido de inmersión en KNO ₃ al 0.2% durante 8 horas.	Bhoyar <i>et al.</i> , 2010
62	Pre remojar semillas en H ₂ SO ₄ por 40 min seguido de inmersión en 400 ppm de GA ₃ por 2 horas.	Bhoyar <i>et al.</i> , 2010
26	Tratar semillas con 30 Kr de rayos gamma seguido de 40 min de H ₂ SO ₄ concentrado.	Bhoyar <i>et al.</i> , 2010
Inefectivo	Otros tratamientos de escarificado, estratificación y tratamientos con agua caliente.	Bhoyar <i>et al.</i> , 2010
Inefectivo	Acetona, alcohol y HNO ₃ rompieron la cubierta pero no hubo germinación.	Bhoyar <i>et al.</i> , 2010
98	Lixiviación + 1000 ppm de GA ₃	Farhoudi & Makezadeh, 2013
75	Lixiviación + 500 ppm de GA ₃	Farhoudi & Makezadeh, 2013
42	2000 mg/L de GA ₃ por 24 horas.	Hessam <i>et al.</i> , 2012
26	4000 mg/L de KNO ₃ por 24 horas.	Hessam <i>et al.</i> , 2012
Inefectivo	Tratamiento de semillas con H ₂ SO ₄ .	Hessam <i>et al.</i> , 2012
Arriba del 80	Tratamientos con ácido salicílico a [100], [200], [300] mg/L y GA ₃ a 125 ppm a un nivel e sequía de 0.3 MPa.	Heydariyan <i>et al.</i> , 2014
64	Escarificar las semillas con H ₂ SO ₄ al 1% para después remojarlas en GA ₃ al 0.04%, refrigerarlas por una semana y finalmente sembrarlas en sustrato de suelo.	Khalil <i>et al.</i> , 2009
Cercano al 70	Semillas pre tratadas con H ₂ SO ₄ por 20 min, lavadas con agua destilada estéril por 10 min y sumergidas en GA ₄₊₇ a 100 ppm por 90 min.	Sozzi & Chiesa, 1995

1.7.2 Propagación

Se han reportado distintos procedimientos de cultivo y propagación *in vitro* de tejidos vegetales (Tabla 8) desarrollados para la propagación rápida de plantas de alcaparro (*Capparis spinosa*). A este respecto se deben de tener en cuenta varias observaciones: no siempre a mayor concentración de RCV se tendrán más beneficios en el cultivo *in vitro*, los RCV que funcionan para una especie no necesariamente lo hacen para las demás especies vegetales y la heterogeneidad de la población afecta a la proliferación y regeneración, pero de acuerdo con los resultados obtenidos, la micropropagación de alcaparro a gran escala se puede lograr con un alto porcentaje de supervivencia de las plántulas (Rodríguez *et al.*, 1990).

Para analizar los efectos sobre el crecimiento de brotes *in vitro* de alcaparro se han reportado tratamientos con radiación gamma, mostrando que las dosis bajas de radiación tuvieron un efecto estimulante. Se estudiaron los efectos sobre el área foliar, longitud de brotes, y porcentaje de brotes enraizados (Al-Safadi & Elias, 2011). El mejor tratamiento de irradiación para aumentar el área foliar fue el Gy dosis 10 en el que el área media de la hoja *in vitro* era de 2.4 cm² en comparación con 1.1 cm² del control, también reportan una estimulación del crecimiento cuando los brotes fueron irradiados con radiación gamma (Al-Safadi & Elias, 2011).

El aumentar la concentración de BAP también incrementó el número de brotes y longitud de los mismos en presencia de aditivos. La inducción de yemas axilares fue más numerosa en medio complementado con BAP en comparación con medio reemplazado por Kn (Vijay *et al.*, 2014). El tratamiento con BAP después de un periodo de cultivo de 60 días, demostró ser una agente eficaz de proliferación en todas las concentraciones ensayadas mediante la estimulación de tasas específicas del desarrollo de los brotes múltiples simultáneos. BAP a concentración de 4 µM facilitó una alta tasa de proliferación, disparó el desarrollo y no estuvo asociado con la inducción de callos, pero en concentraciones mayores (6 y 8 µM) estimuló un mayor número de brotes (Carra *et al.*, 2012a), pero también alteró la morfología de los microtallos hacia una mayor fasciación provocando una

mala elongación. BAP en una concentración menor, (2 µM), indujo una baja proliferación de brotes, aunque estimuló la elongación (Rodríguez *et al.*, 1990). Desafortunadamente, después de un cultivo continuo en las concentraciones de BAP (2 y 4 µM), los tejidos perdieron su capacidad de proliferación después de cinco subcultivos y la longitud de los brotes inducidos también decreció. Los brotes más vigorosos se obtuvieron en medio MS adicionado con 2 mg/LZR, 0.1 mg/L de GA₃ y 1 mg/L de NAA. Sin embargo después de varios subcultivos en este medio modificado, apareció una desorganización basal en los tejidos y la vitrificación se detectó en los brotes (Rodríguez *et al.*, 1990). También se ha probado la efectividad de BAP comparada con la de la zeatina, indicando que para la formación de brotes el mejor tratamiento fue el de zeatina a 1 mg/L, sin aparición de tejido caloso (Chalak & Elbitar, 2006).

Como ya se mencionó, la presencia continua de altos niveles de BAP en el medio resulta en la supresión de la elongación de los brotes, pero en este caso de *C. decidua*, y las bajas concentraciones (1 mg/L) muestran una rápida elongación de los mismos (Tyagi & Kothari, 1997).

El único estudio donde se inocularon frutas de alcaparro fue el de Al-Safadi & Elias (2011), donde reportan que el mejor medio de formación de callo fue el medio MS adicionado con 1 mg/L de BA, y 0.1 mg/L de NAA; las piezas de callos eran grandes, friable con color amarillo pálido. Indican también que las frutas pequeñas (menos de 2 cm de diámetro) arrojaron mejores resultados que las frutas de mayor tamaño en términos de tamaño y calidad de la formación de callo en todos los medios estudiados. Pero no fueron capaces de regenerar plantas a partir de este callo.

Tabla 8. Resumen de los diferentes tratamientos aplicados para el cultivo y propagación *in vitro* de *Capparis spinosa*, excepto en los casos en los que se indique otra especie.

Resultados	Tratamientos	Referencias
Longitud media de los brotes 3.1 cm.	Longitud de los brotes de alcaparras en medio MS.	Al-Safadi & Elias, 2011
5.5 brotes en promedio.	El mejor medio en inducir la formación de brotes adventicios fue MS3 (2 mg/L ZR,	Al-Safadi & Elias, 2011

	0.1 mg/L GA ₃ y 1 mg/L de NAA).	
No muestran datos.	El mejor medio para la inducción de callo a partir de hoja y de brotes fue el MS9 (1 mg/L de BA, y 0.1 mg/L de NAA) y el MS12 (2 mg/L de 2,4-D, 1 mg/L NAA y 0.1 mg/L de GA ₃).	Al-Safadi & Elias, 2011
Produce un promedio 2 plantas por cada pieza de callo cultivada.	Mejor medio para la regeneración de plantas a partir de callo, el MS6 (1 mg/L KIN, y 0.1 mg/L de IAA).	Al-Safadi & Elias, 2011
Callos grandes, friables con color amarillo pálido.	Los mejores medios de formación de callo a partir de frutas fueron MS9 (1 mg/L BAP, 0.1 mg/L NAA) y MS10 (0.5 mg/L Kin y 2 mg/L de 2,4-D). Pero no fueron capaces de regenerar plántulas a partir de este callo.	Al-Safadi & Elias, 2011
Número promedio de brotes por explante 8.9 ± 1.6.	Medio MS para la multiplicación de brotes complementado con 6 µM BAP + 0.12 µM IBA.	Carra <i>et al.</i> , 2012a
La tasa de multiplicación promedio fue de 9.	La única combinación explante/medio que respondió fueron óvulos sin fertilizar incubados en 13 µM de BA.	Carra <i>et al.</i> , 2012b
Generándose de 8 a 10 brotes apropiados para enraizar.	Explantos nodales primarios en medio de multiplicación (MS solidificado; complementado con 88 mM sacarosa, 6.6 µM BA y 0.25 µM IBA).	Carra <i>et al.</i> , 2012b
Respuesta de explantes fue del 75.5%	Formación de brotes el mejor tratamiento fue con zeatina 1 mg/L, sin formación de tejido caloso.	Chalak & Elbitar, 2006
Se produjeron de 4 a 7 brotes/explante dentro de las 3 primeras semanas.	El número máximo de brotes producidos para <i>C. decidua</i> ocurrió en medio MS con 0.1 mg/L de NAA + 5.0 mg/L de BAP +	Deora & Shekhawat, 1995

	aditivos.	
Se produjo una media de 7.2 ± 1.3 brotes/explante. Longitud promedio de los brotes 2.76 ± 0.3 cm.	Número máximo de brotes, con el mayor porcentaje de respuesta y con el máximo crecimiento apareció en medio MS con 5.0 mg/L de BAP. Para la especie <i>C. decidua</i> .	Deora & Shekhawat, 1995
Medio WPM: 1.89 cm elongación de brotes, 4.07 nodos y 8.45 hojas.	El medio WPM fue el mejor medio basal para la elongación de brotes, número de nodos y hojas seguido del medio 1/2 MSD.	Musallam <i>et al.</i> , 2011
Número de brotes fue de 4.6 a 4.8, longitud de brotes de 1.78 a 1.82 cm	Los mejores parámetros de crecimiento y multiplicación se obtuvieron a BAP (1.2 mg/L), Kin (0.8 mg/L) y Zea (1.6 mg/L).	Musallam <i>et al.</i> , 2011
Porcentaje de respuesta 80%. Brotes por explante 4.	Explantes con una o dos yemas axilares se cultivaron horizontalmente en medio MS2 (medio MS con la mitad de fuerza de nitratos, pero el doble de cloruro de calcio y sulfato de magnesio, adicionado con 0.5 mM m-inositol, 3 μ M tiamina, 32.5 μ M ácido nicotínico, 0.5 μ M piridoxina-HCl y 11.5 μ M ácido ascórbico) a 4 μ M de BAP.	Rodríguez <i>et al.</i> , 1990
Después de cinco subcultivos, tasa de proliferación fue de 20/1 cada 20 días.	Medio MS3 (misma composición que el medio MS2 pero con el cloruro de calcio incrementado cinco veces con respecto al medio MS).	Rodríguez <i>et al.</i> , 1990
Número promedio de brotes por cultivo 6 ± 1.4 .	Los mejores resultados en la multiplicación de brotes por medio de explantes nodales de <i>C. decidua</i> , se obtuvieron en el medio con BAP (5 mg/L),	Tyagi & Kothari, 1997
Cotiledones: 40% de respuesta, no. prom. de brotes/explante 7.5 ± 1.8 .	Para <i>C. decidua</i> , la mejor multiplicación ocurrió en medio suplementado con 5 mg/L de BAP, en los cotiledones y en los	Tyagi & Kothari, 1997

Nodos cotiledonarios: 100% de respuesta, no. prom. brotes/explante 12.9 ± 1.9.	nodos cotiledonarios usados como explantes que se obtuvieron de las plántulas.	
Número de brotes 20.0 ± 2.0.	La combinación que disparo la máxima formación de brotes fue en medio MS suplementado con 2 mg/dm ³ de BA y 0.5 mg/dm ³ de NAA, en <i>C. decidua</i> .	Tyagi <i>et al.</i> , 2010
El 75% de los explantes nodales respondió con 3-4 brotes por explante de 3 a 4 semanas.	Inducción de brotes <i>in vitro</i> en Medio MS suplementado con 17.76 µM de BAP + 0.54 µM NAA y ácido ascórbico (50 mg/L), ácido cítrico (30 mg/L), sulfato de adenina (30 mg/L). Para plantas de <i>C. decidua</i> .	Vijay <i>et al.</i> , 2014
Tasa de multiplicación de brotes de 6-7 veces en un período de 4 semanas.	Multiplicación de brotes en medio MS suplementado con 8.88 µM BAP+0.57 µM IAA y ácido ascórbico (50 mg/L), ácido cítrico (30 mg/L), y sulfato de adenina (50 mg/L). En plantas de <i>C. decidua</i> .	Vijay <i>et al.</i> , 2014

1.7.3 Enraizamiento

Se ha reportado que en algunas plantas de *C. spinosa* se inició la formación de raíces adventicias sin la aplicación de ningún tratamiento, mientras que otras necesitaron de diferentes RCV, por lo general de auxinas; la tasa de enraizamiento inducido por las auxinas está determinada por su tipo y su concentración (Carra *et al.*, 2012b). Las auxinas inducen la formación de raíces mediante la ruptura de la dominancia apical inducida por la citoquinina. IBA se utiliza ampliamente debido a que no es tóxico para la mayoría de las plantas en un amplio espectro y promueve el crecimiento de la raíz en un gran número de especies de plantas, incluidos los brotes de los árboles leñosos (Deora & Shekhawat, 1995; Khalil *et al.*, 2012). En este último estudio el mayor porcentaje de enraizamiento se logró con menores concentraciones de IBA y NAA. Para Vijay *et al.* (2014) IBA es la mejor

auxina para la inducción de raíces *in vitro*, comparada con NAA e IAA, además de que se ha reportado que la incorporación de NAA e IAA en lugar de IBA provocan la formación de tejido calloso (Deora & Shekhawat, 1995). Para el caso de *C. decidua*, el mejor tratamiento de enraizamiento fue también con IBA a bajas concentraciones (1 mg/L).

Otros experimentos de enraizamiento se realizaron por inmersión de los brotes durante 10 min en soluciones de IBA o IAA, en algunos casos el enraizamiento no mejoró en cuanto a la longitud pero se desarrollaron raíces vigorosas (Rodríguez *et al.*, 1990), en otros casos, un alto porcentaje de explantes enraizaron alcanzando el 100% (Carra *et al.*, 2012b). Por otra parte Chalak & Elbitar (2006) reportan que el mejor tratamiento para enraizar fue someter los brotes a un tratamiento de pulso dejándolos un periodo en oscuridad en solución concentrada de IAA para luego pasarlos a medio MS a la mitad de su fuerza. La irradiación (exposición de algún material a uno de los tipos de radiación ionizante) con dosis bajas estimuló el enraizamiento de los brotes, donde el porcentaje de enraizamiento se incrementó de 75% a 100% a la dosis de 10 Gray, Gray o Gy es la medida de la cantidad de radiación ionizante absorbida, equivalente a un joule de energía depositada por kilogramo de masa (Al-Safadi & Elias, 2011; Cleveland & Morris, 2006; Licker, 2003). Además de las tres auxinas IBA, IAA y NAA Carra *et al.* (2012a), obtuvieron enraizamiento con dos derivados de la difenilurea (2,3-MDPU y 3,4-MDPU), confirmando la actividad rizogénica directa de los MDPUs en un arbusto perenne, también mencionan que los compuestos ureídicos inducen la formación de raíces sin tener que estar suplementados con auxinas, sin tratamiento en la oscuridad, sin tener que transferir a GRF en la luz y sin la formación de tejido calloso.

Para la generación de raíces en esquejes, estacas o injertos se ha observado que al aumentar el IBA o el NAA de 100 a 400 ppm, aumenta el porcentaje de enraizamiento, pero a concentraciones muy grandes (1000 ppm) este se inhibe (Khalil *et al.*, 2012). Estudios anteriores sobre injertos de varias especies concluyen que la eficacia de las aplicaciones de la hormona auxina en la promoción de enraizamiento está influenciada por la concentración de la hormona, los métodos de aplicación, la eficacia comparativa de las diferentes auxinas sintéticas y época del año en la que se realizan las aplicaciones (Khalil *et al.*, 2012). Al-Safadi & Elias (2011) reportan la utilización de estacas recolectadas de

los campos para obtener plántulas enraizadas listas para la siembra en el campo alcanzando un porcentaje de enraizamiento del 100% cuando se aplicó una dosis de 10 Gy de irradiación gamma. En cuanto a la propagación de alcaparro por medio de estacas Carra *et al.*, (2012b) mencionan que es difícil, especialmente durante la inducción del enraizamiento y que no es comercialmente factible.

Tabla 9. Resumen de los diferentes tratamientos para el enraizamiento de *Capparis spinosa*, excepto en los casos en los que se indique otra especie.

Enraizamiento	Tratamientos	Referencias
Porcentaje de enraizamiento se incrementó de 75% a 100%	Radiación gamma sobre el enraizamiento de brotes el tratamiento fue de Gy dosis 10.	Al-Safadi & Elias, 2011
Porcentaje de brotes con raíces 93.7%	Mejor porcentaje de enraizamiento, sistema radical bien desarrollado con varias raíces laterales (1 μM 2,3-MDPU siempre en luz) y (10 μM IBA 6 días oscuridad el resto en medio GRF en luz).	Carra <i>et al.</i> , 2012a
Porcentaje de enraizamiento 93.7%, longitud de raíces 28 mm. Número promedio de raíces por brote 2.4 y 3.5, respectivamente.	El medio con 5 μM de IBA dio el mejor porcentaje de enraizamiento así como la longitud máxima promedio de las raíces. Los tratamientos con mayor número promedio de raíces por brote fueron (5 μM IAA) y (1 μM NAA).	Carra <i>et al.</i> , 2012b
100% de explantes enraizados.	El mejor tratamiento de inmersión temporal para la obtención de raíces fue el de 50 μM de IBA durante 10 min.	Carra <i>et al.</i> , 2012b
Las raíces brotaron a los 15 días y a los 45 días se tuvo un índice del 87%	La mejor respuesta de enraizamiento se obtuvo después de 4 horas de tratamiento en pulso un periodo en oscuridad en solución concentrada de IAA seguido de cultivo en medio MS con la mitad de fuerza.	Chalak & Elbitar, 2006

Porcentaje de enraizamiento 16.8 ± 2.9%	Para <i>C. decidua</i> el mejor medio para el enraizamiento fue el MS con fuerza media, gelificado con agar y suplementado con 2.5 mg/L de IBA.	Deora & Shekhawat, 1995
Porcentaje de brotes enraizados 66.0 ± 4.1%, número promedio de raíces por brote 4.0 ± 1.0 y longitud promedio de las raíces 3.4 ± 1.0 cm.	Para <i>C. decidua</i> el enraizamiento mejoró utilizando un tratamiento de pulso de 4 h con 100 mg/L de IBA en ½MS, seguidos de la transferencia a ½MS, libre de hormonas, con 500 mg/L de carbón activado y gelificado con agar.	Deora & Shekhawat, 1995
Porcentajes de enraizamiento 79.39%, 65.45% y 75%, respectivamente.	Tratamiento de las estacas de madera semidura de <i>Capparis spinosa</i> con 400 ppm IBA, 100, 400 ppm de NAA.	Khalil <i>et al.</i> , 2012
Porcentaje de enraizamiento 80%, longitud de las raíces 15.5 mm y número de brotes 4.2.	El medio con IAA a 5.0 mg/L arrojó el mayor porcentaje de enraizamiento, longitud de las raíces y número de brotes con raíces.	Musallam <i>et al.</i> , 2011
Porcentaje de enraizamiento 70%.	Mayor enraizamiento con IAA a 30 µM después de un período de incubación de 20 días en la oscuridad	Rodríguez <i>et al.</i> , 1990
Porcentaje de enraizamiento 65%. Número de raíces de 2-4 (1-4 cm de longitud).	Para <i>C. decidua</i> , el mayor porcentaje de enraizamiento ocurrió en medio MS con 1 mg/L de IBA.	Tyagi & Kothari, 1997
Número de raíces adventicias generadas de 4 a 20.	IBA (0.5 a 3 mg/dm ³) fue el tratamiento más efectivo en la inducción de raíces en <i>C. decidua</i> .	Tyagi <i>et al.</i> , 2010
Máxima respuesta	Enraizamiento de plantas <i>C. decidua</i> en	Vijay <i>et al.</i> ,

94.44% con media de 5-6 raíces por brote.	medio MS con ¼ de fuerza + 4.92 µMIBA+ ácido ascórbico (50 mg/L) y ácido cítrico (30 mg/L) e incubado a 31°C.	2014
---	---	------

1.7.4 Aclimatación

En la mayoría de los casos consultados, la aclimatación ha reportado porcentajes altos de sobrevivencia de las plantas, arriba del 80% (Al-Safadi & Elias, 2011; Carra *et al.*, 2012a; Chalak & Elbitar, 2006; Vijay *et al.*, 2014). Carra *et al.*, (2012b) y Deora & Shekhawat, (1995), por otra parte, reportaron porcentajes de plantas aclimatadas del 68 al 75%



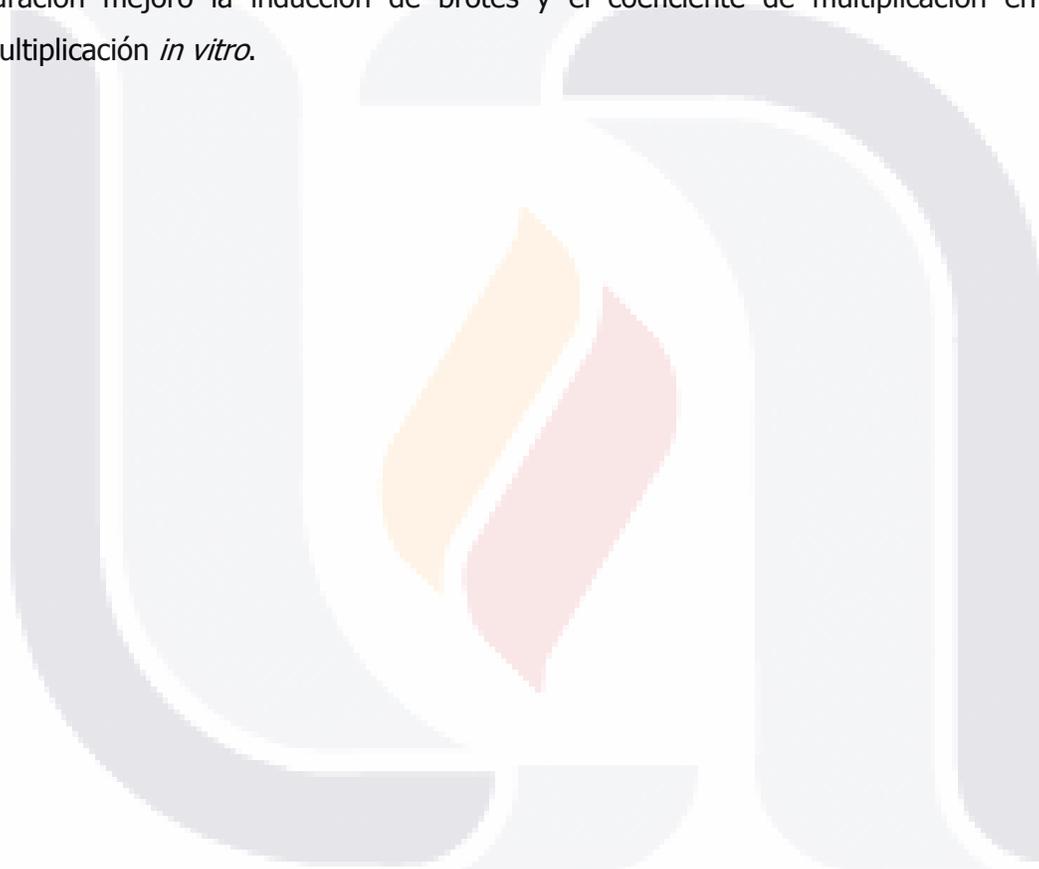
Tabla 10. Resumen de los diferentes tratamientos de aclimatación para *Capparis spinosa*, excepto en los casos en los que se indique otra especie.

Aclimatación	Tratamientos	Referencias
Porcentaje de sobrevivencia 86%	Se trasladaron 48 plantas de alcaparro a macetas de 6 L con suelo y se colocan en el invernadero.	Al-Safadi & Elias, 2011
Porcentaje de sobrevivencia 82%	Con brotes enraizados en 1 μ M 2,3-MDPU siempre en luz.	Carra <i>et al.</i> , 2012a
Porcentaje de plantas aclimatadas 68 y 70%, respectivamente.	La calidad de las raíces con los tratamientos de 25 y 50 μ M de IBA, fueron buenas cuando se transfirieron <i>ex vitro</i> .	Carra <i>et al.</i> , 2012b
Porcentaje de sobrevivencia del 92%	En el periodo de endurecimiento, las plántulas que enraizaron <i>in vitro</i> , mayores a 3 cm, fueron exitosamente aclimatadas.	Chalak & Elbitar, 2006
Porcentaje de sobrevivencia 75%	Aproximadamente 100 plantas de <i>C. decidua</i> que fueron desarrolladas <i>in vitro</i> fueron aclimatadas y transferidas a campo.	Deora & Shekhawat, 1995
No reportan porcentaje de sobrevivencia.	Plantas enraizadas generadas <i>in vitro</i> se transfirieron a macetas plásticas con mezcla de tierra, perlita y composta (1:1:1), se mantuvieron húmedas, se colocaron en bolsas que gradualmente fueron siendo removidas y se pasaron a un invernadero por 3 semanas.	Musallam <i>et al.</i> , 2011
La tasa de supervivencia fue del 80%	Las plantas de <i>C. decidua</i> fueron endurecidas y colocadas en el suelo.	Vijay <i>et al.</i> , 2014

Por lo tanto, el uso de la micropropagación o propagación *in vitro* podría ser beneficiosa en la aceleración de la multiplicación a gran escala, así como para la mejora y conservación de la planta de alcaparro (Musallam *et al.*, 2011; Vijay *et al.*, 2014), ya que permitiría mantener los genotipos de interés para producir un gran número de nuevos

individuos de buena calidad y uniformidad (Carra *et al.*, 2012a), pero es necesario desarrollar y mejorar las técnicas de siembra y propagación vegetativa para asegurar su adopción por parte del sector agrícola (Khalil *et al.*, 2012).

Vilchez & Albany, (2014) comprobaron que el sistema de inmersión temporal favoreció el crecimiento y la formación de brotes de guayabo. Determinándose que el empleo de sistemas de inmersión temporal tipo RITA® con 3 ó 4 inmersiones al día de 2 min de duración mejoró la inducción de brotes y el coeficiente de multiplicación en la fase multiplicación *in vitro*.



2. Justificación del proyecto

El alcaparro es una especie de alto valor medicinal, económico y ecológico; que muestra características muy interesantes para las regiones de clima semiseco (tal es el caso de Aguascalientes), como son la resistencia a la falta de agua y a altas concentraciones salinas. Por este motivo el cultivo del alcaparro puede ser una alternativa eficiente, productiva y rentable para las zonas con baja disponibilidad de agua y/o con altas concentraciones de sal. Sin embargo, la propagación de esta especie por métodos convencionales (germinación de semillas en campo) es poco eficiente debido a la dormancia de las semillas. Este problema podría resolverse a través de la propagación masiva del alcaparro por métodos biotecnológicos como lo son: el uso de biorreactores, la aplicación de RCV y el uso de la RFA. Este trabajo de tesis aportará un nuevo protocolo de micropropagación para la producción eficiente de plántulas de esta especie, con las consecuentes ventajas que se tienen al trabajar con sistemas de propagación *in vitro*. Este protocolo de propagación podría ser aplicado para la generación de plantas de alcaparro en un número suficiente para establecer parcelas o huertos experimentales con el fin de conocer si es viable su cultivo en la región.

3. Hipótesis

El alcaparro (*C. spinosa*), puede ser propagado *in vitro* de forma eficiente si se determinan las condiciones óptimas para cada una de las etapas de este proceso: establecimiento *in vitro*, multiplicación, enraizamiento y adaptación y transferencia a suelo.

4. Objetivos

OBJETIVO GENERAL: Desarrollar y establecer un protocolo eficiente y económicamente rentable para la producción de plántulas de alcaparro (*Capparis spinosa*).

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Generar cultivos *in vitro* a través de la desinfección y germinación de semillas en medio nutritivo MS (Murashige-Skoog).
- Conocer el efecto de varios tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal (RCV) en la multiplicación a partir de meristemas (yemas axilares y ápices). Esto con el fin de seleccionar el tratamiento más eficiente en cuanto al número y calidad de los brotes producidos.
- Seleccionar el tratamiento y condiciones de cultivo más adecuadas para generar raíces en los brotes obtenidos.
- Aclimatar las plántulas generadas a suelo.
- Probar si es posible escalar el proceso desarrollado a sistemas más productivos como lo son biorreactores de inmersión temporal.
- Determinar el costo aproximado de las plantas que se generarían de los procesos desarrollados.

5. Metodología

5.1 Procedimiento de desinfección y ruptura de dormancia (germinación)

Se obtuvieron semillas de *C. spinosa* de origen canadiense las cuales se sometieron a los siguientes procedimientos de desinfección: al primer grupo se les adicionó H_2SO_4 concentrado durante 20 minutos, se enjuagaron con agua corriente, seguido de la adición de etanol al 70% durante 45 segundos, se volvieron a enjuagar y se desinfectaron con Cloralex[®] al 15% durante 15 minutos, se tapó el vaso con papel aluminio, abriéndose hasta encontrarse en condiciones asépticas, donde se les retiró el Cloralex[®] y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Y se colocaron en frascos con medio MS, una parte de los frascos se colocó en refrigeración durante 17 días y el resto se colocaron en el cuarto de incubación.

Al siguiente grupo de semillas se le realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno, con agua corriente y jabón líquido Dermoclean[®] (10 mL/L), se enjuagaron con agua corriente, se colocaron en etanol al 70% durante 45 segundos, se volvieron a enjuagar y se desinfectaron con Cloralex[®] al 15% durante 15 minutos, se tapó el vaso con papel aluminio, abriéndose hasta encontrarse en condiciones asépticas, donde se les retiró el Cloralex[®] se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en 500 mg/L de GA_3 durante 24 horas. Después de este tiempo se colocaron en frascos con medio MS, una parte de los frascos se colocó en refrigeración durante 17 días y el resto se colocaron en el cuarto de incubación.

El último grupo de semillas tuvo un tratamiento parecido al anterior solo que en lugar de dejarse las semillas durante 24 horas en GA_3 , éstas se dejaron durante 120 horas, después de lo cual fueron tratadas nuevamente con Cloralex[®] pero en esta ocasión al 10% y finalmente se colocaron en frascos con medio MS, una parte de los frascos se colocó en refrigeración durante 17 días y el resto se colocaron en el cuarto de incubación.

Todas las semillas germinadas de estos tratamientos se pasaron a medio MS con 0.5 mg/L de BA.

5.2 Material Vegetal

El material vegetal con el que se trabajó se encontraba en medio MS con fitohormona BA, (estas plántulas fueron obtenidas de semillas germinadas de origen Argentino), de aquí se tomaron brotes de al menos 0.5 cm de longitud que se colocaron en medio MS con carbón activado de manera vertical, colocándose 20 explantes por recipiente de cultivo. Los pasos anteriores se realizaron varias veces para contar con suficiente material vegetal. Después de transcurridos 56 días se realizó un conteo de los explantes que se pudieran utilizar en los siguientes tratamientos con fitohormonas, debiendo de cumplir con tener al menos una yema y ser mayores de 0.5 cm de longitud.

5.3 Pruebas con los RCV

El primer diseño experimental se realizó con la introducción de un solo RCV, se utilizó el medio MS complementado con una de las siguientes citocininas: BA, 2iP, Cin, MT ó TDZ; de todas ellas se probaron las concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5 ó 2.0 mg/L. Como tratamiento control se utilizó medio MS sin RCV. Los explantes que se utilizaron fueron de aproximadamente 0.5 cm de longitud, con al menos una yema, se colocaron de forma vertical en el medio cuidando de que la yema quedara cerca del medio nutritivo pero sin sumergirla en el mismo, a cada frasco se le colocaron tres explantes, esto se realizó por quintuplicado para cada tratamiento.

En el siguiente diseño experimental se utilizaron las fitohormonas que tuvieron mejores resultados en la prueba anterior; (2iP, BA, MT y Cin en concentraciones de 1, 2 ó 3 mg/L); y se combinaron con la auxina NAA a 0.5 mg/L en medio MS. Los explantes se colocaron de la misma manera y en la misma cantidad que el experimento anterior, pero en esta ocasión las pruebas se realizaron por sextuplicado. Como prueba control se utilizó la

concentración de 2 mg/L de cada citocinina en medio MS sin la presencia de la fitohormona NAA.

5.4 Análisis Estadístico

Se supuso que los datos de los diseños experimentales cumplían con el supuesto de independencia y aleatoriedad, pero se comprobó que no cumplían con los otros dos supuestos, normalidad y homocedasticidad, por lo que se intentó la transformación box-cox y aún así continuaron sin cumplir con los supuestos; por lo que se utilizó un análisis no paramétrico de datos longitudinales en experimentos factoriales. El análisis estadístico se realizó con el programa R versión 3.2.3 (2015-12-10), utilizando la librería nparLD versión 2.1 de la misma manera que lo realizaron Noguchi *et al.*, (2012). Con un $\alpha = 0.05$.

5.5 Enraizamiento

Las pruebas de enraizamiento se realizaron con los brotes que se obtuvieron de los tratamientos con fitohormonas, que tenían al menos una yema y con una longitud mínima de 0.5 cm, estos fueron colocados en medio MS y medio MS con carbón activado. Se realizó lo mismo con las masas de brotes no diferenciados y menores a 0.5 cm de longitud que en algunos casos se obtuvieron de determinados tratamientos. Algunos frascos de medio MS y MS con carbón activado, (con explantes y con masas de brotes), se colocaron en la luz blanca y otros frascos se colocaron bajo lámparas de RFA.

5.6 Aclimatación

Para las pruebas de aclimatación se utilizó un protocolo base, excepto donde se indique; a todos los frascos con las plántulas desarrolladas se les aflojó la tapa y se dejaron así durante 14 días en el cuarto de cultivo, transcurrido este tiempo se pasaron cuatro plántulas por bolsa con sustrato Mezcla ProMix[®], colocándose en el invernadero y también se taparon con bolsas transparentes para aumentar la humedad relativa y permitir el paso de la luz, tiempo después se les retiró la bolsa transparente y poco después se sacaron del

invernadero, en este momento se toman datos y se volvieron a tomar 30 días después. Las diferencias de los distintos protocolos se muestran a continuación:

1. Para el primer protocolo, a los frascos con plántulas desarrolladas se les aflojó la tapa y se dejaron así durante 22 días, después de transcurrido este tiempo las plántulas se colocaron en sustrato Mezcla ProMix[®], tres plántulas por maceta, posteriormente se les agregó agua, las macetas se colocaron dentro de bolsas transparentes y fueron situadas en la cámara bioclimática con condiciones preestablecidas de temperatura entre 22-24 °C, humedad 50-60% y fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad).
2. En el segundo protocolo se les dejó la bolsa transparente durante 17 días. 7 días después de quitarles la bolsa transparente se sacaron del invernadero.
3. El tercer protocolo se les dejó la bolsa transparente durante 17 días. A los 60 días se sacaron del invernadero.
4. Cuarto protocolo las plántulas de este procedimiento se encontraban en RFA al momento del enraizamiento y al pasarlas al invernadero se les dejó la bolsa transparente durante 3 días. A los 60 días se sacaron del invernadero.

5.7 Biorreactores

Se utilizaron biorreactores de inmersión temporal RITA[®] a los cuales se les colocaron tres explantes, se utilizaron masas de brotes, (ver sección 6.2). Los medios de cultivo utilizados fueron MS adicionado con BA ó 2iP ambos a la concentración de 1 mg/L y los biorreactores se programaron con 4 ó 6 inmersiones por día, con una duración de dos minutos cada inmersión; se le llama inmersión al tiempo que se encuentra en contacto el medio líquido con los explantes.

6. Resultados

6.1 Germinación

El único tratamiento que logró romper la dormancia de las semillas fue en el que se utilizó H_2SO_4 (figura 14), los otros dos, con GA_3 durante 24 horas y GA_3 durante 120 horas, no obtuvieron ni una semilla germinada. El tratamiento con H_2SO_4 fue muy asincrónico apareciendo 2 semillas germinadas a los 67 días, otras 3 semillas a los 104 días y una última semilla a los 234 días de haber sido inoculadas. Obteniendo un porcentaje final de germinación del 15%, y este tratamiento fue el único que no presentó ninguna contaminación.



Figura 14. Apariencia de algunas de las plántulas germinadas.

6.2 Pruebas con RCV

Se realizó el conteo del número de brotes presentes en los explantes de cada concentración, teniendo en cuenta que debían de ser de al menos 0.5 cm de longitud y contar con mínimo una yema, también se realizaron observaciones de la longitud de los mismos, se consideró como explantes chicos los que presentaron una longitud entre 0.5 y 1 cm, explantes grandes los que tuvieron una longitud mayor a 1 cm. En algunos explantes apareció una masa o racimo de brotes poco diferenciados, con hojas muy pequeñas y poco desarrolladas, los brotes de estas masas no excedían la longitud 0.5 cm. Aproximadamente y en promedio cada masa contenía 10 brotes y su tamaño era de 0.5 a 1 cm³.

Tabla 11. Resumen de los brotes obtenidos en el tratamiento control (sin RCV).

Control	Número promedio de brotes por explante	0.86
	De 0.5 a 1 cm de longitud	1
	Mayores a 1 cm de longitud	12
	Masa de brotes	0

Tabla 12. Resumen de datos obtenidos con cada RCV a las concentraciones indicadas.

RCV		Concentración (mg/L)			
		0.5	1.0	1.5	2.0
2iP	No. promedio de brotes/explante	1.40	1.46	0.73	1.13
	De 0.5 a 1 cm de longitud	15	14	5	9
	Mayores a 1 cm de longitud	6	8	6	8
	Masa de brotes	1	2	4	4
BA	No. promedio de brotes/explante	1.13	1.66	1.00	1.86
	De 0.5 a 1 cm de longitud	6	8	4	12
	Mayores a 1 cm de longitud	11	17	11	16
	Masa de brotes	4	3	2	2
Cin	No. promedio de brotes/explante	1.40	0.80	1.13	1.26
	De 0.5 a 1 cm de longitud	9	8	5	11
	Mayores a 1 cm de longitud	12	4	12	8
	Masa de brotes	0	1	0	2
TDZ	No. promedio de brotes/explante	0.33	0.40	0.33	0.13
	De 0.5 a 1 cm de longitud	4	5	3	0
	Mayores a 1 cm de longitud	1	1	2	2
	Masa de brotes	3	1	1	1
MT	No. promedio de brotes/explante	1.33	1.60	1.60	1.80
	De 0.5 a 1 cm de longitud	4	10	8	9
	Mayores a 1 cm de longitud	16	14	16	18
	Masa de brotes	3	1	3	3

Tabla 13. Apariencia de los brotes y de las masas de brotes en cada tratamiento con los RCV. Todas las líneas representan 1 cm de longitud.

RCV	Brotes	Masas de Brotes
2iP		
BA		
Cin		
TDZ		



Tabla 14. Resumen de datos obtenidos con la combinación de NAA (0.5 mg/L), con distintos RCV, a las concentraciones indicadas.

NAA + RCV		Concentración (mg/L)			
		C	1.0	2.0	3.0
2iP	No. promedio de brotes/explante	1.50	1.33	1.33	1.27
	De 0.5 a 1 cm de longitud	9	10	7	13
	Mayores a 1 cm de longitud	18	14	17	10
	Masa de brotes	2	2	2	3
BA	No. promedio de brotes/explante	2.33	1.94	3.22	2.55
	De 0.5 a 1 cm de longitud	24	26	36	31
	Mayores a 1 cm de longitud	18	9	22	15
	Masa de brotes	4	5	3	4
MT	No. promedio de brotes/explante	3.60	1.41	2.06	1.33
	De 0.5 a 1 cm de longitud	27	8	15	12
	Mayores a 1 cm de longitud	27	9	16	7
	Masa de brotes	2	3	5	10
Cin	No. promedio de brotes/explante	0.77	0.44	0.38	0.33
	De 0.5 a 1 cm de longitud	4	5	3	5
	Mayores a 1 cm de longitud	10	3	4	1
	Masa de brotes	0	0	0	0

Tabla 15. Apariencia de los brotes y de las masas de brotes en cada tratamiento, con NAA (0.5 mg/L) y los respectivos RCV. Todas las líneas representan 1 cm de longitud.

NAA + RCV	Brotes	Masas de Brotes
2iP		
BA		
MT		

Cin		En ningún caso presentó masas de brotes.
------------	---	--

La Figura 15 muestra el resumen de todos los tratamientos con RCV que se probaron en los dos diseños experimentales, tomando como parámetro el número promedio de brotes por explante.

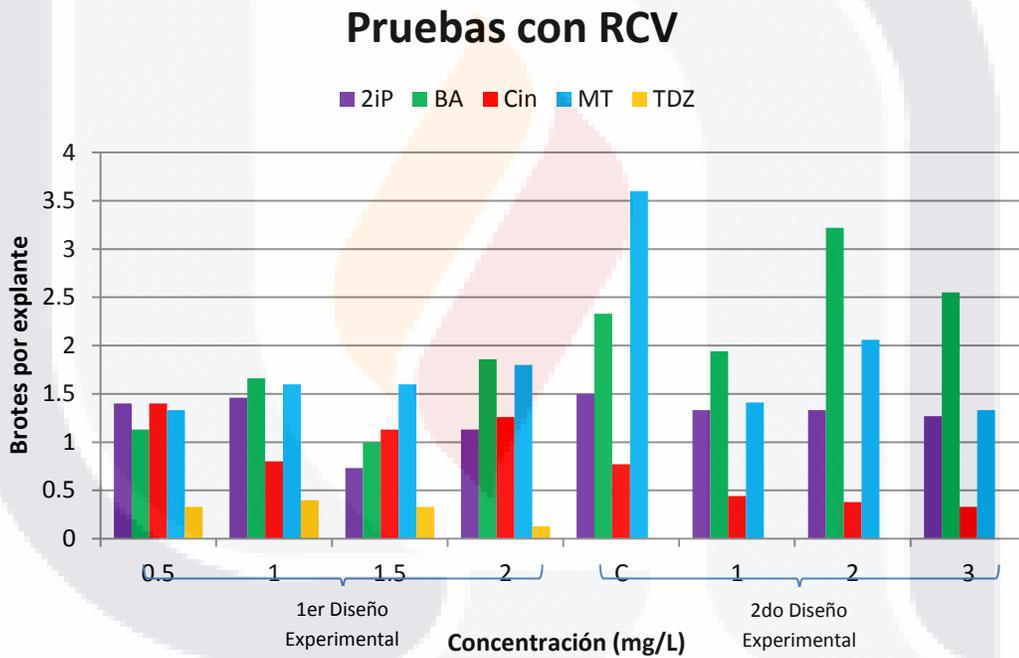


Figura 15. Gráfico resumen del número de brotes por explante de todos los tratamientos probados de los RCV y sus respectivas concentraciones. El RCV TDZ no se utilizó en el segundo diseño experimental.

6.3 Análisis Estadístico

La figura 16 muestra las gráficas de efectos relativos de cada una de los distintos RCV con sus concentraciones, para los dos diseños experimentales. En la gráfica del primer diseño experimental puede verse que el RCV TDZ arrojó los peores resultados, en todas las concentraciones ensayadas, mientras que los mejores fueron la MT (1, 1.5 y 2 mg/L), el

2iP (1 mg/L) y BA (2 mg/L). El segundo diseño experimental, de forma general, muestra que la Cin (en todas las concentraciones) tuvo los menores efectos relativos junto con dos concentraciones de MT (1 y 3 mg/L), los mejores valores que se pueden observar son MT (C) y BA (2 y 3 mg/L). Las concentraciones control (C) carecen del RCV NAA.

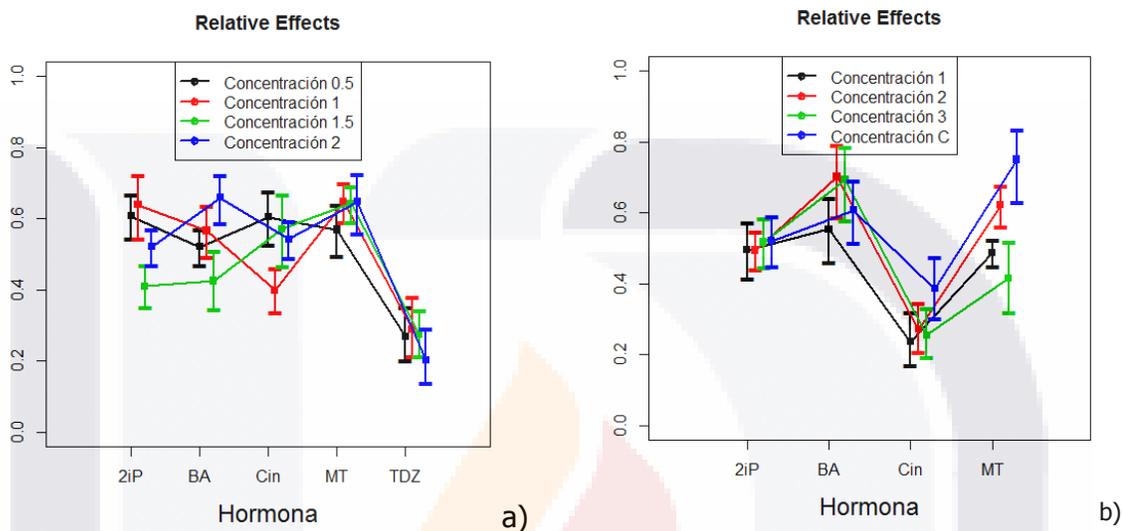


Figura 16. Gráficas de efectos relativos de los distintos tratamientos con RCV. De a) Primer diseño experimental y b) Segundo diseño experimental.

6.4 Enraizamiento

Utilizando explantes de color verde en su totalidad, se obtuvo el porcentaje de enraizamiento de los distintos tratamientos; con los dos tipos de medios nutritivos utilizados, MS y MS con carbón activado, que se expusieron a dos diferentes tipos de iluminación, luz blanca y RFA, (Tabla 16). En la tabla 17 se observan las plántulas de los distintos tratamientos; no se apreciaron diferencias morfológicas significativas. Al utilizarse explantes con tallo rojizo, el porcentaje de enraizamiento disminuyó drásticamente, resultando desde un 8.4% hasta un 16.5% La mayoría de las raíces presentaban un color café con una longitud promedio de 1 cm, un grosor de alrededor de 1 mm y aparecieron en promedio 5 raíces por explante; otro tipo de raíces, que aparecieron en menor número en algunos de los explantes, eran de color blanco con el grosor de 1/3 de mm, con un promedio de 1.5 cm de longitud y en promedio cada explante tenía 8 raíces.

Tabla 16. Resumen del porcentaje de enraizamiento de los diferentes tratamientos, en medio MS y MS con carbón, sometidos a luz blanca y RFA.

Iluminación \ Medio	MS	MS con carbón activado
Luz blanca	80%	51.4%
RFA	80%	61.4%

Tabla 17. Apariencia de las plántulas de los diferentes tratamientos de enraizamiento. Todas las líneas representan 5 cm.

Iluminación \ Medio	MS	MS con carbón activado
Luz blanca		
RFA		

6.5 Aclimatación

Los porcentajes de sobrevivencia obtenidos corresponden a los cuatro diferentes protocolos empleados. Se tomaron cuatro datos de cada uno de los tratamientos: basados en el tipo de medio (MS Y MS con carbón activado) y en dos parámetros temporales (al sacarse del invernadero y 30 días después de haberse sacado) tabla 18.

Tabla 18. Porcentaje de sobrevivencia de las plántulas respecto a los distintos protocolos de aclimatación.

Protocolos	Medio	Porcentaje de sobrevivencia	
		Al sacarse del invernadero [∞]	30 días después de sacarse del invernadero
Primero*	MS	0	0
Segundo	MS	85	75
	MS con carbón activado	74	74
Tercero	MS	39	5.8
	MS con carbón activado	65	18.6
Cuarto	MS	35	8.8
	MS con carbón activado	47	21.9

* Excepto el primer protocolo que se mantuvo dentro de la cámara bioclimática todo el tiempo.

[∞] Segundo protocolo, datos tomados a los 24 días de transferirse al sustrato. Tercero y cuarto protocolos, datos tomados a los 60 días de transferirse al sustrato



Figura 17. Apariencia general de las plantas de tratamiento de aclimatación. a) Al sacarse del invernadero y b) 15 días después.

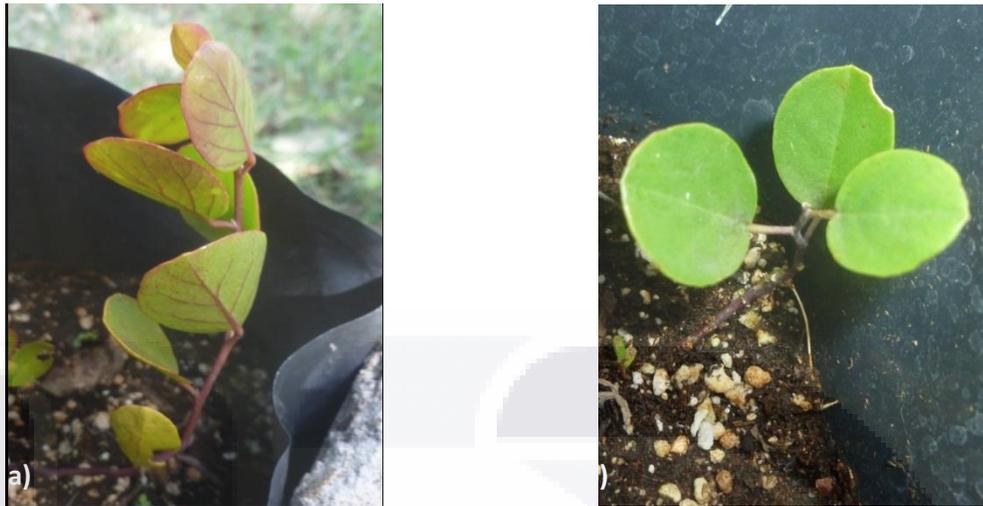


Figura 18. Apariencia de algunas de las plantas a los 188 días (casi 7 meses) de haber sido transferidas a suelo, a) planta que se encuentra expuesta de forma intermitente a la radiación solar y b) planta que se encuentra todo el tiempo a la sombra.

6.6 Biorreactores

A los 60 días de haber sido cultivados en biorreactores, el medio adicionado con 2iP (1 mg/L) produjo 51 y 53 brotes promedio por explante, a 4 y 6 inmersiones respectivamente, también a los 60 días el medio suplementado con BA (1 mg/L) con 4 inmersiones por día, produjo 38.5 brotes promedio por explante y 14.33 brotes promedio por explante con 6 inmersiones diarias. Se obtuvieron 89 brotes en el sistema con medio MS complementado con BA (1 mg/L) a 4 inmersiones diarias durante 90 días, lo que vuelve a este último, el mejor de todos los sistemas probados.

Las tablas 19 y 20 muestran la apariencia de los brotes de alcaparro en biorreactores, las fotografías se tomaron aproximadamente de 7 a 10 días. De forma general los tratamientos mostraron una gran cantidad de brotes generados (en algunos casos hasta ocho veces más comparados con el medio semisólido), bien diferenciados y con tamaños variables; los brotes existentes elongaron bastante y los nuevos brotes fueron menores a los ya existentes pero de tamaño aceptable. El único caso donde no se cumplieron las características anteriores fue en el tratamiento de BA a 6 inmersiones donde se obtuvo

una menor cantidad de brotes y de menor calidad, no bien diferenciados y algunos presentaron hiperhidricidad y necrosamiento especialmente en las hojas.

Tabla 19. Apariencia de los brotes de alcaparro en los biorreactores con medio MS complementado con BA a 4 y 6 inmersiones.

Número de inmersiones por día	
4	6
	
	
	
	

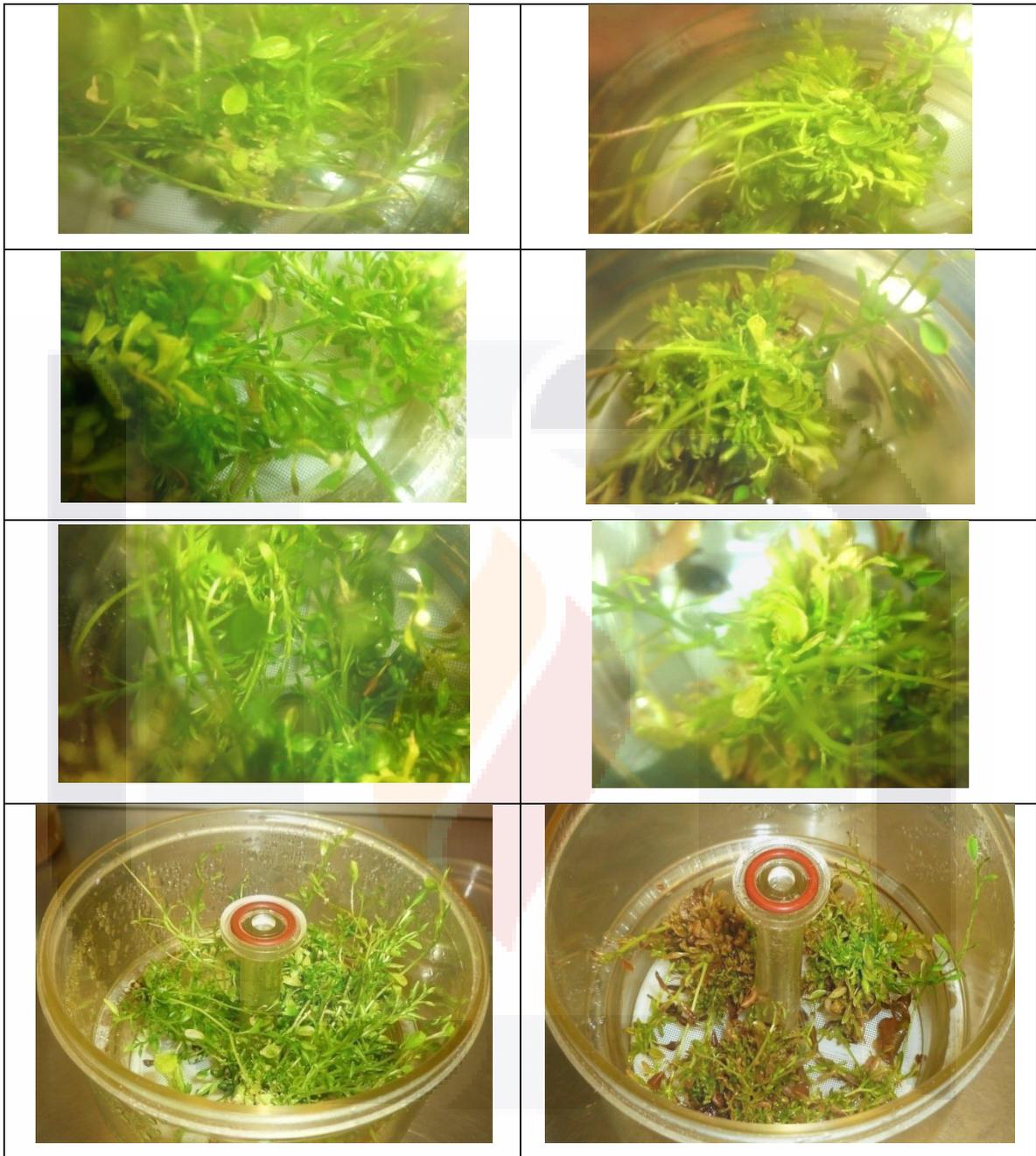
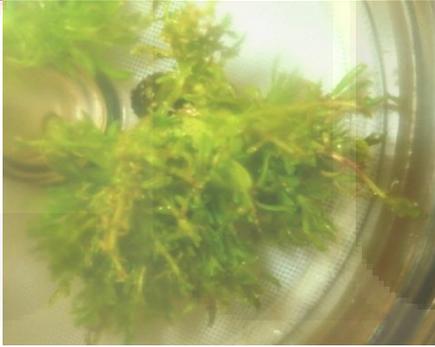
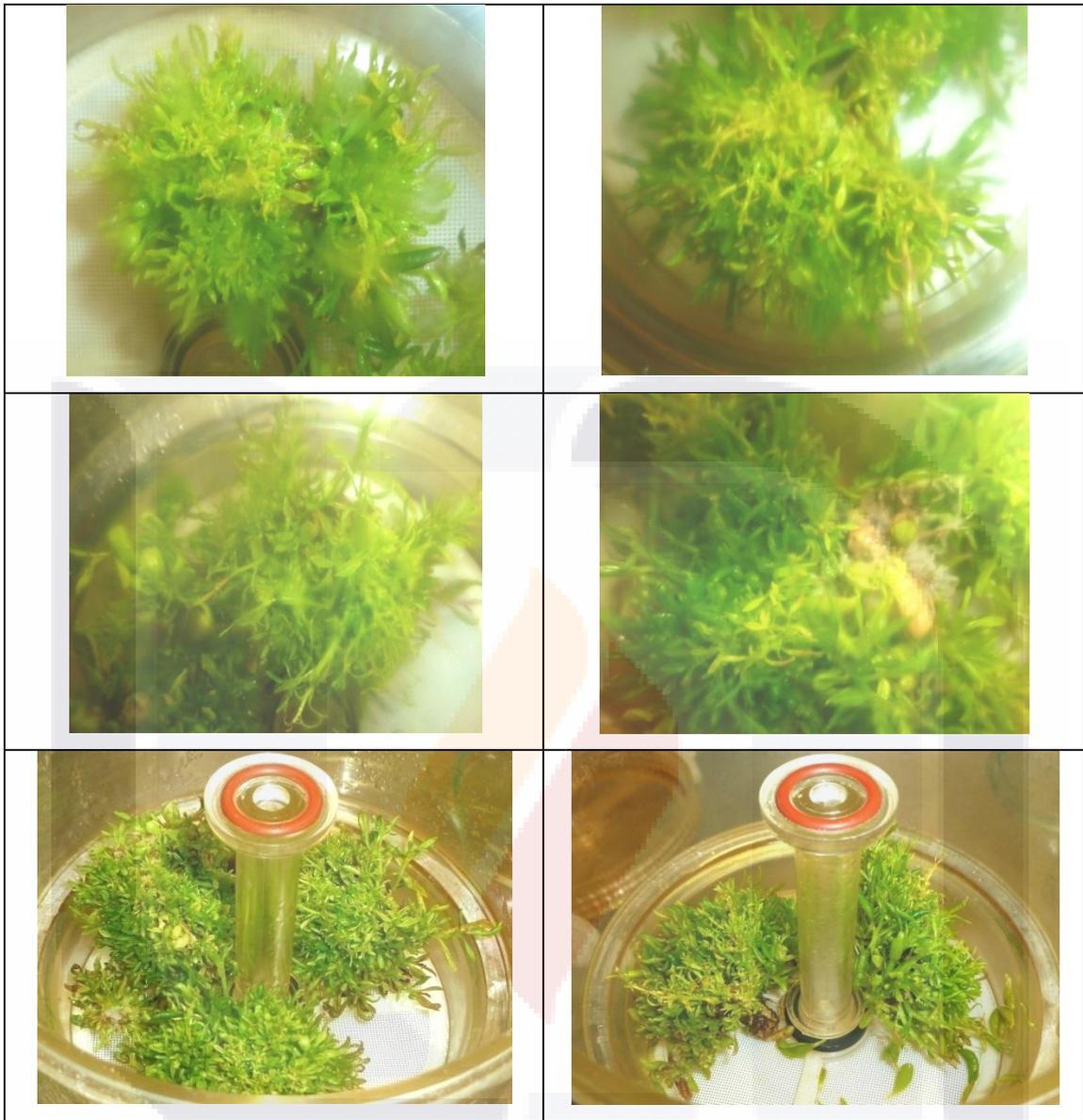


Tabla 20. Apariencia de los brotes en los biorreactores con medio MS complementado con 2iP a 4 y 6 inmersiones.

Número de inmersiones por día	
4	6
	
	
	
	



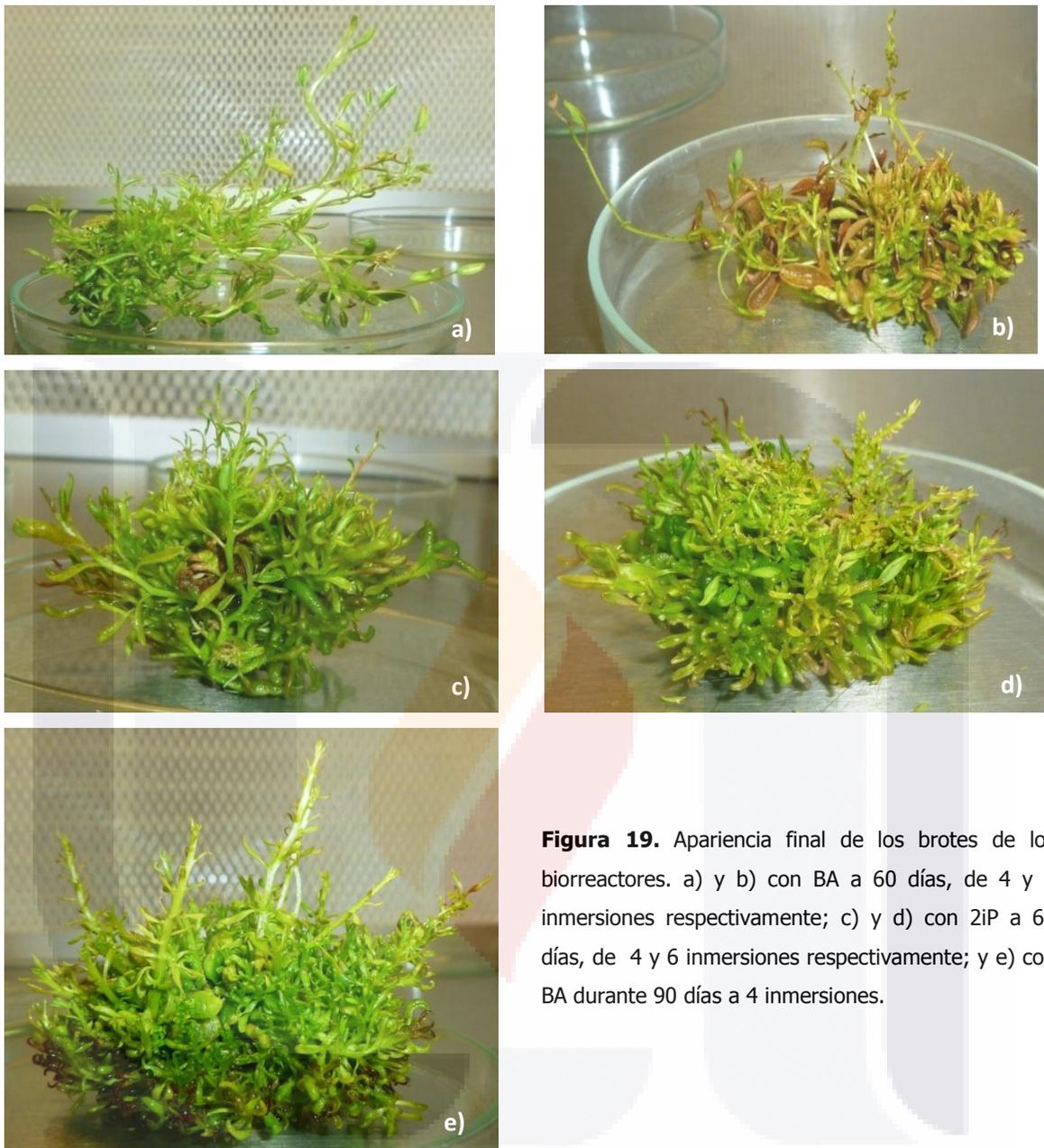
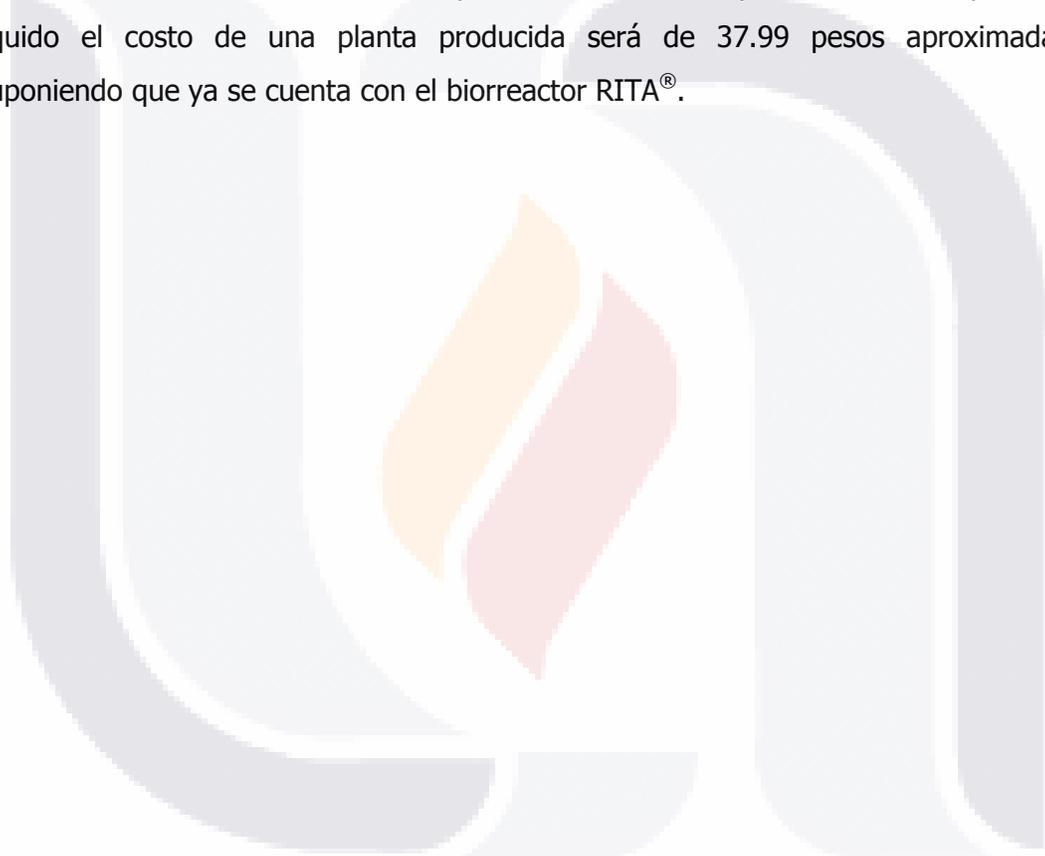


Figura 19. Apariencia final de los brotes de los biorreactores. a) y b) con BA a 60 días, de 4 y 6 inmersiones respectivamente; c) y d) con 2iP a 60 días, de 4 y 6 inmersiones respectivamente; y e) con BA durante 90 días a 4 inmersiones.

Tomando en cuenta sólo las pruebas que arrojaron los mejores resultados y suponiendo que no se contamine o muera el explante, se puede realizar un análisis general del sistema desarrollado. Por lo que partiendo de un solo explante se pueden obtener 3.6 explantes con medio MS complementado con MT a 2 mg/L en 54 días, pasando estos explantes a luz blanca en medio MS sin RCV enraizarán 2.88 explantes, a los 154 días y para la aclimatación, si se utiliza el segundo protocolo, sobrevivirán 2.16 plantas a los 208

días (7 meses). Si se utilizando un biorreactor de inmersión temporal RITA[®] con MS complementado con BA (1 mg/L) a 4 inmersiones, partiendo de un explante, se pueden obtener 89 brotes en 90 días, pasando estos explantes a luz blanca en medio MS sin RCV enraizarán 71.2 explantes, a los 190 días y para la aclimatación, si se utiliza el segundo protocolo, sobrevivirán 53.4 plantas a los 244 días (8 meses). Para calcular el costo aproximado de una planta producida se tomaron costos de las páginas phytotechlab.com e hydroenv.com.mx con el tipo de cambio de 18.9 pesos/dólar. Una planta producida en medio semisólido tendrá un costo aproximado de 84.30 pesos, mientras que en medio líquido el costo de una planta producida será de 37.99 pesos aproximadamente, suponiendo que ya se cuenta con el biorreactor RITA[®].



DISCUSIONES

En la germinación de las semillas se obtuvo el valor del 15% con el tratamiento de H_2SO_4 y en los dos tratamientos con GA_3 la germinación fue del 0%. El valor de germinación obtenido con el tratamiento de H_2SO_4 es inferior a los obtenidos por otros autores, que también trabajaron con alcaparras, Al-Safadi & Elias (2011) y Bhoyar *et al.* (2010) con un 32% y un 33%, respectivamente y es superior a lo mencionado por Hessam *et al.* (2012) porque ellos mencionan que es inefectivo. Comparando los tratamientos utilizados de GA_3 con Hessam *et al.* (2012) ellos obtuvieron un porcentaje de germinación mayor, del 42%, pero usaron una concentración cuatro veces mayor del RCV (2000 mg/L de GA_3 por 24 horas) y al parecer el tiempo no es tan determinante en el porcentaje de germinación con este RCV. Se ha mencionado que las semillas de alcaparras frescas germinan fácilmente pero en un porcentaje muy bajo y las semillas con que se trabajó no eran semillas frescas; el secado de semillas induce inactividad, dormancia o latencia severa, que es difícil de superar de forma natural (Hessam *et al.*, 2012) lo que provoca la dormancia fisiológica y física.

En cuanto a la generación de brotes a partir de yemas, en el primer diseño experimental, en el que se utilizó un solo regulador de crecimiento vegetal por tratamiento, los mejores resultados se obtuvieron con BA y MT, ambas a 2 mg/L, con un número promedio de brotes por explante de 1.86 y 1.80 respectivamente. El TDZ arrojó los menores resultados en todas las concentraciones probadas obteniéndose la menor respuesta con la concentración de 2 mg/L con un promedio de 0.13 brotes por explante, por lo que no se utilizó en la siguiente prueba. Musallam *et al.* (2011) concuerdan con que el RCV BAP presentó los mejores resultados, con un número promedio de brotes por explante de 4.6 a 4.8, pero ellos utilizaron medio WPM a la concentración de 1.2 mg/L. Carra *et al.* (2012b) utilizaron óvulos sin fertilizar como explantes y los cultivaron en 13 μM de BA; consiguieron una tasa de multiplicación promedio de 9. Para la especie *Capparis decidua* Deora & Shekhawat (1995) produjeron el mayor número de brotes/explante (7.2 ± 1.3) en MS suplementado con 5.0 mg/L de BAP, y Tyagi & Kothari (1997) obtuvieron la mejor multiplicación en medio MS suplementado con 5 mg/L de BAP con un número de brotes promedio de 6 ± 1.4 .

En el segundo diseño experimental, donde se utilizaron dos RCV por tratamiento, los resultados cambian y el mejor RCV es MT en la prueba control, seguida de BA a 2 mg/L, ambas en MS, con un número promedio de brotes por explante de 3.60 y 3.22 respectivamente. En este caso la Cin fue la de menor número de brotes en todas las concentraciones siendo la peor la de 3 mg/L con 0.33 brotes por explante y en ninguna de las concentraciones probadas con Cin aparecieron las masas de brotes. Al-Safadi & Elias (2011) utilizaron el RCV BA en combinación con otros aditivos solo para obtener tejido calloso. Carra *et al.* (2012a) utilizaron MS con 6 μM BAP + 0.12 μM IBA para la multiplicación obteniendo 8.9 ± 1.6 brotes por explante. Carra *et al.* (2012b) colocaron explantes en MS, complementado con 88 mM sacarosa, 6.6 μM BA y 0.25 μM IBA generando de 8 a 10 brotes. Rodríguez *et al.* (1990) obtuvieron una respuesta del 80% en medio MS2 con 4 μM de BAP, consiguieron 4 brotes/explante. En la especie *Capparis decidua*; Deora & Shekhawat (1995) consiguieron el número máximo de brotes producidos con MS suplementado con 0.1 mg/L de NAA + 5.0 mg/L de BAP + aditivos, produciendo de 4 a 7 brotes/explante. Para Tyagi *et al.* (2010) la máxima formación de brotes fue en medio MS suplementado con 2 mg/dm^3 de BA y 0.5 mg/dm^3 de NAA, con número de brotes 20.0 ± 2.0 . El mejor tratamiento de Vijay *et al.* (2014) para la inducción de brotes fue MS con 17.76 μM de BAP + aditivos, obteniendo de 3 a 4 brotes por explante.

Los tratamientos consultados no utilizaron sólo una fitohormona con el respectivo medio de crecimiento, son combinaciones de varias fitohormonas y otros aditivos. Todos los tratamientos consultados mostraron un mejor rendimiento en cuanto a número de brotes por explante se refiere en comparación con mis resultados pero sin tomar en cuenta las denominadas masas de brotes, que en promedio presentaron diez brotes por explante, pero en algunos casos podían contener hasta dieciocho brotes por explante. Por lo que tomando los valores obtenidos de las masas de brotes, para el primer diseño experimental con la hormona BA, se pueden obtener hasta 6.86 brotes por explante, siendo este resultado mayor al reportado por Musallam *et al.* (2011) y menor al de Carra *et al.* (2012b) para *Capparis spinosa*. Para la especie *Capparis decidua* mi resultado es menor al de Deora & Shekhawat (1995) y mayor o igual al reportado por Tyagi & Kothari (1997). Mientras que para el mejor tratamiento del segundo diseño experimental, con hormona

MT en la prueba control y contando las masas de brotes, se pueden obtener hasta 8.60 brotes por explante, este valor es muy cercano a los reportados, para *Capparis spinosa*, por Carra *et al.* (2012a) y Carra *et al.* (2012b) y es mayor a lo citado por Rodríguez *et al.* (1990). Comparando el resultado obtenido con *Capparis decidua*, este es claramente menor al de Tyagi *et al.* (2010) y mayor a los de Deora & Shekhawat (1995) y Vijay *et al.* (2014). También cabe mencionar que la mayoría de los medios consultados en bibliografía contenían mayores cantidades de aditivos y de distintos tipos. Estas combinaciones de fitohormonas con otros aditivos pueden generar medios muy complicados, como es el caso de los medios preparados por Rodríguez *et al.* (1990) y Vijay *et al.* (2014). Todo esto demuestra que la respuesta de los tejidos depende o está condicionada al tipo de medio utilizado, los distintos aditivos que contenga, el explante con el que se trabaje y la especie vegetal.

Las masas de brotes son muy importantes porque son una gran fuente de explantes, dependiendo del tratamiento, aproximadamente cada masa de brotes presentó la cantidad de diez explantes. El potencial de estas masas se debe a que se pueden extraer los explantes, de tamaño suficiente, de cada una de ellas y éstas se pueden volver a colocar en medio nutritivo para que sigan produciendo más brotes y elongando los ya existentes; debido a la pérdida de la dominancia apical, además de que pueden utilizarse en biorreactores para producir hasta ocho veces más explantes con la consecuente elongación de los mismos.

El análisis estadístico muestra que existen diferencias entre los distintos tratamientos de los dos diseños experimentales para una ANOVA-TypeStatistic (ATS) con un valor $\alpha = 0.05$. Para el primer diseño experimental se obtienen los valores-p de $3.480512e-14$, $8.695364e-03$ y $1.086200e-09$; para el efecto de la Hormona, la Concentración y la interacción Hormona:Concentración, respectivamente. En el segundo diseño experimental el valor-p para la Hormona es de $1.711636e-10$, para la Concentración es $5.645761e-09$ y para la interacción Hormona:Concentración es de $1.597445e-05$. Lo que demuestra que en ambos diseños experimentales existe al menos un tratamiento que es estadísticamente diferente, por lo que se deben de hacer comparaciones por pares de los tres factores en cada uno de los diseños experimentales.

En el primer diseño experimental los mejores tratamientos, que no son significativamente diferentes; con un $\alpha = 0.05$, son 2iP a 0.5 y 1 mg/L; Cin a 0.5 y 1.5 mg/L y MT a 1, 1.5 y 2 mg/L. Los peores tratamientos fueron con el RCV TDZ en todas las concentraciones ensayadas. En el segundo diseño experimental los mejores tratamientos son BA a 2 y 3 mg/L, y MT en la concentración control. Los tratamientos con menor respuesta fueron con el RCV Cin a 1, 2 y 3 mg/L. Para ver los valores-p, pasar a los anexos. Este análisis demuestra que estadísticamente existe influencia en la hormona que se utiliza, su concentración y la interacción de la hormona con la concentración.

En biorreactores (medio líquido) el mejor tratamiento fue MS con BA con 4 inmersiones diarias durante 90 días arrojando 89 brotes promedio por explante, seguido del tratamiento con 2iP con alrededor de 50 brotes por explante a los 60 días. Estos resultados son bastante buenos porque comparados con los obtenidos, en este trabajo en medio semisólido, el medio líquido es cerca de ochenta veces mejor y con respecto al mejor resultado reportado en bibliografía, en medio semisólido MS suplementado con BA y NAA para la especie *C. decidua*, el medio líquido es cuatro veces mejor. Los peores tratamientos fueron BA en 60 días a 4 y 6 inmersiones diarias, este último tratamiento necrosó los tejidos principalmente las hojas. La diferencia entre los tratamientos de BA con 4 inmersiones durante 90 y 60 días se puede deber a que los brotes que van apareciendo van produciendo otros brotes nuevos, por lo que la producción de brotes se hace de manera exponencial.

Ninguno de los artículos encontrados acerca de la micropropagación de *Capparis spp.* mencionan el uso de biorreactores en sus procedimientos, existe el uso de estos sistemas, pero para otras especies vegetales como lo son: *Pinus radiata* (Aitken-Christie & Jones, 1987), Banana (Alvard *et al.*, 1993), *Saccharum spp.* (Lorenzo *et al.*, 1998), *Ananas comosus* (Escalona *et al.*, 1999), arboles de coníferas (Gupta & Timmis, 2005), *Psidium guajava* L. (Vilchez & Albany, 2014), entre otras. Todos ellos mencionan los efectos positivos en una o varias de las etapas de proliferación de los tejidos vegetales. Etienne & Berthouly, (2002) mencionan que los índices de proliferación son mejores así como los índices de sobrevivencia en la aclimatación del material vegetal. En este estudio se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

concuera con que los índices de proliferación, número de brotes producidos por explante, son mucho mejores en sistemas de biorreactores de inmersión temporal comparados con el medio semisólido, tal como lo mencionan Etienne & Berthouly, (2002); Gupta & Timmis, (2005); Mamun *et al.*, (2015); Vilchez & Albany, (2014) y Ziv, (2005)

El enraizamiento demostró ser el mismo para las dos condiciones de iluminación (luz blanca y RFA) del 80%, en medio MS. El medio MS con carbón activado arrojó mejores resultados con la RFA que con la luz blanca (61.4 y 51.4%, respectivamente). En los diferentes tratamientos no se apreciaron diferencias morfológicas significativas. Los explantes con tallo rojizo presentaron las peores respuestas a los tratamientos de enraizamiento (8.4 – 16.5%). Esto se debe a que la tonalidad rojiza de los tallos indica que esos explantes ya se encontraban en una etapa de madurez avanzada por lo que les fue más difícil generar raíces.

Los valores de enraizamiento cercanos al valor obtenido en este estudio son los reportados por Musallam *et al.* (2011), Chalak & Elbitar (2006) y Rodríguez *et al.* (1990) todos ellos utilizaron IAA, obteniendo 80%, 87% y 70% de enraizamiento, respectivamente. Además Khalil *et al.* (2012) utilizó IBA con un porcentaje de enraizamiento del 79.39. Reportan mejores resultados Carra *et al.* (2012a) con 2,3-MDPU e IBA, Carra *et al.* (2012b) utilizando IAA, igualmente con un tratamiento de inmersión temporal con IBA. Con los respectivos porcentajes de enraizamiento de 93.7, 93.7 y 100. Al-Safadi & Elias (2011) sólo mencionan que dosis bajas de Radiación gamma mejoran el enraizamiento de brotes, pero no aportan datos.

Para la especie *C. decidua* Tyagi & Kothari (1997) utilizan IBA con un porcentaje de enraizamiento de 65. Tyagi *et al.* (2010) reportan que el tratamiento más efectivo fue con IBA, dando como resultado el número de raíces adventicias generadas de 4 a 20. Vijay *et al.* (2014) en medio MS con $\frac{1}{4}$ de fuerza adicionado con IBA y otros aditivos tuvieron la máxima respuesta de 94.44%. Deora & Shekhawat (1995) mejoran su porcentaje de enraizamiento utilizando un tratamiento de pulso con IBA en $\frac{1}{2}$ MS obteniendo así un porcentaje de brotes enraizados de $66.0 \pm 4.1\%$

Los distintos RCV, concentraciones y explantes afectan el porcentaje de enraizamiento. A diferencia de este estudio en el que sólo se utiliza MS, en otras investigaciones (Rodríguez *et al.*, 1990; Khalil *et al.*, 2012; Tyagi & Kothari, 1997; Deora & Shekhawat, 1995); utilizan algún RCV en el medio de enraizamiento, aún así las tasas de enraizamiento obtenidas en este trabajo son bastante altas (80%) y en algunos casos incluso mayores que los que reportan con el uso de algún RCV; con las ventajas adicionales de facilidad de preparación del medio de cultivo y reducción de los costos.

El mejor protocolo de aclimatación fue en el que se dejaron flojas las tapas de los frascos durante 14 días dentro del cuarto de cultivo, después se pasaron al sustrato Mezcla ProMix[®], colocándose en el invernadero, se taparon con bolsas transparentes durante 17 días, se les retiró la bolsa transparente y 7 días después se sacaron del invernadero; con este protocolo se obtuvo un 75% de sobrevivencia para las plántulas que se encontraban en MS y el peor protocolo, con ninguna plántula sobreviviente, fue en donde se aflojaron las tapas y se dejaron así durante 22 días, se colocaron las plántulas en sustrato Mezcla ProMix[®], se les colocaron bolsas transparentes y fueron situadas en la cámara bioclimática con condiciones preestablecidas de temperatura entre 22-24 °C, humedad 50-60% y fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad). Los artículos consultados no mencionan una metodología precisa de los tratamientos de aclimatación o endurecimiento de las plántulas enraizadas. Se han reportado porcentajes de sobrevivencia mayores a los obtenidos en esta investigación por Al-Safadi & Elias (2011), Carra *et al.* (2012a), Chalak & Elbitar (2006) y Vijay *et al.* (2014), este último para la especie *C. decidua*, con 86%, 82%, 92%, 80%, respectivamente. Por otro lado Musallam *et al.* (2011) mencionan su procedimiento de aclimatación, pero no reportan el porcentaje de sobrevivencia de las plantas enraizadas; y Deora & Shekhawat (1995) obtuvieron el mismo valor de sobrevivencia que el obtenido en este trabajo, pero para la especie *C. decidua*.

Los procedimientos aplicados en la presente tesis demuestran que es muy importante mantener la humedad relativa al inicio de la aclimatación e irla disminuyendo de forma gradual conforme avanzan los días. Cabe mencionar que a los 30 días después de sacarse del invernadero, las plántulas que se enraizaron en MS adicionado con carbón activado tuvieron un índice de mortalidad menor que las que se enraizaron en MS, esto puede ser

debido a que la presencia del carbón activado oscurece el medio de cultivo haciendo que se asemeje más a las condiciones naturales en el sustrato y disminuye la disponibilidad de ciertos compuestos del mismo lo que provoca que las plantas se vayan endureciendo ya que en el sustrato la planta competirá por los nutrientes con microorganismos presentes en el mismo.

Las plantas que se extrajeron del invernadero se colocaron en tres lugares distintos: sol, sol/sombra y sombra. Las plantas que se colocaron en el sol sufrieron mucho daño por la radiación, el daño fue disminuyendo mientras menos expuestas al sol estuvieran, esto puede ser por el ciclo de las xantofilas. Las hojas que crecen a plena luz del sol contienen una mayor concentración de xantofilas que las hojas que crecen en la sombra, este ciclo puede ayudar protegiendo contra las altas temperaturas; los cloroplastos son más tolerantes al calor cuando acumulan zeaxantinas (Taiz & Zeiger, 2002). Se recomienda colocar las plantas en sol/sombra para permitir que se vayan aclimatando a las condiciones de la radiación solar directa e impedir que sufran daños severos que les causen la muerte y es importante que las plantas tengan agua abundante para obtener así una mejor respuesta a la aclimatación.

CONCLUSIONES

Utilizar H_2SO_4 fue efectivo tanto para la desinfección como para la germinación de las semillas, siendo menos efectivo el uso de GA_3 , la combinación de ambos no se probó en este trabajo, pero algunas fuentes bibliográficas indican que es aún mejor.

Para el cultivo *in vitro* en medio MS semisólido se recomienda suplementarlo con MT a 2 mg/L ya que presentó los mejores resultados incluso que BA a 2 mg/L con NAA a 0.5 mg/L. Los peores resultados se obtuvieron con el uso de TDZ y Cin respectivamente.

Para enraizar el mejor medio fue el MS (con un 80% de enraizamiento), ya sea con luz blanca o con RFA y no se deben de utilizar explantes en estado de madurez avanzada.

El mayor porcentaje de aclimatación (80%) se obtuvo con el protocolo consistente en aflojar las tapas de los frascos y dejarlos así durante catorce días en el cuarto de cultivo, entonces se colocan en el invernadero en sustrato Mezcla ProMix[®], se les coloca una bolsa transparente en la parte superior durante 17 días, y a los 24 días se sacan del invernadero. Al ser extraídas del invernadero se recomienda colocarlas a la sombra y asegurarse de que cuenten con agua suficiente.

El mejor medio para usar en biorreactores RITA[®] fue el MS complementado con BA con cuatro inmersiones diarias de dos minutos cada una durante noventa días, con la que se obtuvieron 89 brotes promedio por explante.

BIBLIOGRAFÍA

- Aitken-Christie, J. & Jones, C. (1987). Towards automation: radiata pine shoot hedges *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8, 185-196.
- Al-Safadi, B. & Elias, R. (2011). Improvement of caper (*Capparis spinosa* L.) propagation using *in vitro* culture and gamma irradiation. *Scientia Horticulturae*, 127, 290-297.
- Alvard, D. Côte, F. & Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32, 55-60.
- Aragón, C., Carvalho, L., González, J., Escalona, M. & Amâncio, S. (2010). *Ex vitro* acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. *Biologia Plantarum*, 54 (2), 237-244.
- Bhojwani, S. S. & Dantu, P. K. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. India: Springer.
- Bhojar, M. S., Mishra, G. P. Singh, R. & Singh, S. B. (2010). Effects of various dormancy breaking treatments on the germination of wild caper (*Capparis spinosa*) seeds from the cold arid desert of trans-Himalayas. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 80 (7), 621-625.
- Brown, D. C. W. & Thorpe, T. A. (1995). Crop improvement through tissue culture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11, 409-415.
- Carra, A., Del Signore, M. B., Sottile, F., Ricci, Ada. & Carimi, F. (2012a). Potential use of new diphenylurea derivatives in micropropagation of *Capparis spinosa* L. *Plant Growth Regulators*, 66, 229-237.
- Carra, A., Sajeve, M., Abbate, L., Siragusa, M., Sottile, F. & Carimi, F. (2012b). *In vitro* plant regeneration of caper (*Capparis spinosa* L.) from floral explants and genetic stability of regenerants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109, 373-381.
- Chalak, L. & Elbitar, A. (2006). Micropropagation of *Capparis spinosa* L. subsp. *rupestris* Sibth. & Sm. by nodal cuttings. *Indian Journal of Biotechnology*, 5, 555-558.

- Cleveland, C. J. & Morris, C. (Coordinators). (2006). *Dictionary of Energy*. Italy: Elsevier.
- Collin, H. A. & Edwards, S. (1998). *Plant Cell Culture*. United Kingdom: Springer.
- Curtis, W. R. (2005). Application of bioreactor design principles to plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 255-264.
- Deora, N. S. & Shekhawat, N. S. (1995). Micropropagation of *Capparis decidua* (Forsk.) Edgew. – a tree of arid horticulture. *Plant Cell Reports*, 15, 278-281.
- Endress, R. (1994). *Plant Cell Biotechnology*. Germany: Springer-Publishing Company.
- es.wikipedia.org. Recuperado el 05 de noviembre del 2015 de: https://es.wikipedia.org/wiki/Capparis_spinosa
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y. & Borroto C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18, 743-748.
- Etienne, H. & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion system in plant Micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 215-231.
- Farhoudi, R. & Makezadeh Tafti, M. (2013). The Effect of Seed Dormancy Breaking Methods on Caper (*Capparis spinosa* L.) Germination and Growth. *Scientific Journal of Agronomy and Plant Breeding*, 1 (1), 20-25.
- George, E. F., Hall, M. A. & De Klerk G. J. (Eds.). (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1. The Background*. (3rd Ed.). Netherlands: Springer.
- Georgiev, M. I., Eibl, R. & Zhog, J. J. (2013). Hosting the plant cells *in vitro*: recent trends in bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 3787-3800.
- Gull, T., Anwar, F., Sultana, B., Cervantes Alcayde, M. A. & Nouman, W. (2015). *Capparis* species: A potential source of bioactives and high-value components: A review. *Industrial Crops and Products*, 67, 81-96.
- Gupta, P. K. & Timmis, R. (2005). Mass propagation of conifer trees in liquid cultures-progress towards commercialization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 339-346.
- Hessam Arefi, I., Khani Nejad, S. & Kafi, M. (2012). Roles of Duration and Concentration of Priming Agents on Dormancy Breaking and Germination of Caper

(*Capparis spinosa* L.) for the Protection of Arid Degraded Areas. *Pakistan Journal of Botany*, 44, 225-230.

- Heydariyan, M., Basirani, N., Sharifi-Rad, M., Khmmari, I. & Rafat Poor, S. (2014). Effect of Seed Priming on Germination and Seedling Growth of the Caper (*Capparis spinosa*) Under Drought Stress. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2 (8), 2381-2389.
- Jiang, H. E., Li, X., Ferguson, D. K., Wang, Y. F., Liu, C. J. & Li, C. S. (2007). The discovery of *Capparis spinosa* L. (Capparidaceae) in the Yanghai Tombs (2800 years B.P.), NW China, and its medicinal implications. *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 409-420.
- Khalil Suleiman, M., Ramachandra Bhat, N., Saleh Abdal, M., Jacob, S. & Rachel Thomas, R., Al-Dossery, S. & Bellen, R. (2009). Germination Studies of *Capparis spinosa* L. *Propagation of Ornamental Plants*, 9 (1), 35-38.
- Khalil Suleiman, M., Ramachandra Bhat, N., Jacob, S. & Rachel Thomas, R. (2012). Effect of Rooting Hormones (IBA and NAA) on Rooting of Semi Hardwood Cuttings of *Capparis spinosa*. *Journal of Agriculture and Biodiversity Research*, 1 (7), 135-139.
- Lansky, E. P., Paavilainen, H. M. & Lansky, S. (2014). *Caper The Genus Capparis*. United States of America: CRC Press.
- LI-COR. (2014). *Photosynthetically Active Radiation Measurement. In Applications*. Retrieved from:
<http://www.licor.com/env/applications/photosynthetically.html>
- Licker, M. D. (Coordinator) (2003). *Dictionary of Engineering*. (2nd Ed.). United States of America: McGRAW-HILL.
- Lindsay, D., Poindron, P. & Morales, T. (2014). *Guía de redacción científica: De la investigación a las palabras*. México: Trillas.
- Lorenzo, J. C., González, B. L., Escalona, M., Teisson, C., Espinosa, P. & Borroto, C. (1998). Sugarcane shoot formation in a improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54, 197-200.
- Mamun, N. H. A., Egertsdotter, U. & Aidun, C. K. (2015). Bioreactor technology for clonal propagation of plants and metabolite production. *Frontiers in Biology*, 10(2), 177-193.

- Mehrotra, S., Prakash, O., Mishra, B. N. & Dwevedi, B. (2008). Efficiency of neural networks for prediction of in vitro culture conditions and inoculum properties for optimum productivity. *PlantCell, Tissue and Organ Culture*, 95, 29-35.
- Miao, Y., Ding, Y., Sun, Q. Y., Xu, Z. F. & Jiang, L. (2008). Plant Bioreactors for Pharmaceuticals. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 25, 363-380.
- Musallam, I., Duwayri, M. & Shibli, R. A. (2011). Micropropagation of Caper (*Capparis spinosa* L.) from Wild Plants. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 5(1), 17-21.
- Noguchi, K., Gel, Y. R., Brunner, E. & Konietzschke, F. (2012). nparLD: An R Software Package for the Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments. *Journal of Statistical Software*, 50(12), 1-23.
- Paek, K.Y., Hahn, E. J. & Son, S. H. (2001). Application of Bioreactors for Large-Scale Micropropagation Systems of Plants. *In vitro Cellular & Developmental Biology*, 37, 149-157.
- Paek, K. Y., Chakrabarty, D. & Hahn, E. J. (2005). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 287-300.
- Pérez Molphe Balch, E. M., Ramírez Malagón, R., Núñez Palenius, H. G., y Ochoa Alejo, N. (1999). *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. México: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Rhizopoulou, S. (1990). Physiological Responses of *Capparis spinosa* L. to Drought. *Journal Plant Physiology*, 136, 341-348.
- Roca, W. M. & Mroginski, L. A. (Publishers). (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones*. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Rodríguez, R., CuozzoL., M. R. & Ancora, G. (1990). *In Vitro* Propagation of Caper (*Capparis spinosa* L.). *In Vitro Cell Development Biology*, 26, 531-536.
- Sánchez, J. A., Reyna K., J. A. & Rosas M., C. P. (2009). Comparación del crecimiento *in vitro* de Ají (*Capsicum anuum*) por diferencias en el espectro de luz utilizado. *Revista Científica, Universidad INCCA de Colombia*, 2(14), 69-77.
- Scragg, A. H. (1995). The problems associated with high biomass levels in plant cell suspensions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43, 163-170.

- Sozzi, G. O. & Chiesa, A. (1995). Improvement of caper (*Capparis spinosa* L.) seed germination by breaking seed coat-induced dormancy. *Scientia Horticulturae*, 62, 255-261.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. (3rd Ed.). USA: Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Thangadurai, D. (2007). *Dictionary of Biotechnology*. India: Oxford Book Company.
- Tlili, N., Elfalleh, W., Saadaoui, E., Khaldi, A., Triki, S. & Nasri, N. (2011). The caper (*Capparis* L.): Ethnopharmacology, phytochemical and pharmacological properties. *Fitoterapia*, 82, 93-101.
- Tyagi, P. & Kothari, S. L. (1997). Micropropagation of *Capparis decidua* through *In Vitro* Shoot Proliferation on Nodal Explants of Mature Tree and Seedling Explants. *Journal Plant Biochemistry & Biotechnology*, 6, 19-23.
- Tyagi, P., Khanduja, S. & Kothari, S. L. (2010). *In vitro* culture of *Capparis decidua* and assessment of clonal fidelity of the regenerated plants. *Biologia Plantarum*, 54 (1), 126-130.
- University of Florida: IFAS Extension. (2011). *Photosynthesis. In Plant Management in Florida Waters: An Integrated Approach*. Retrieved from: <http://plants.ifas.ufl.edu/manage/overview-of-florida-waters/water-quality/photosynthesis>
- Vasil, I. K. (1994). Automation of plant propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39, 105-108.
- Vijay, N., Arya, S. & Arya, L. D. (2014). Rapid and Mass Propagation of the Economically Important Desert Plant *Capparis decidua* for its Afforestation Program. *Journal of Arid Land Studies*, 24 (1), 33-36.
- Vilchez, J. & Albany, N. (2014). Multiplicación *in vitro* de *Psidium guajava* L. en sistemas de inmersión temporal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVI(2), 96-103.
- Weathers, P. J., Towler, M. J. & Xu, J. (2010). Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1339-1351.
- Wetzel, R. G. (2001). *Limnology: Lake and River Ecosystems*. (3rd Ed.). USA: Academic Press.

- Zhong, J. J., Yu, J. T. & Yoshida, T. (1995). Recent advances in plant cell cultures in bioreactors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 461-467.
- Ziv, M. (2005). Simple bioreactors for mass propagation of plants. *PlantCell, Tissue and Organ Culture*, 81, 277-285.



