

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA



Inducción y Diferenciación de callos a partir de Hipocótilos y Cotiledones de Repollo
(*Brassica oleracea* var. Royale Vantage) en cultivo *in vitro*

Por:

ULISES NERI CACHO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Agosto 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Inducción y Diferenciación de callos a partir de Hipocótilos y Cotiledones de Repollo
(*Brassica oleracea* var. Royale Vantage) en cultivo *in vitro*

Por:

ULISES NERI CACHO

TESIS

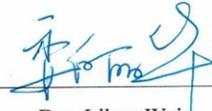
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Asesor Principal Interno



Dra. Lihua Wei
Asesor Principal Externo



Dr. Valentín Robledo Torres
Co-Asesor



Dra. Rosalinda Mendoza Villareal
Co-Asesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Agosto de 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Inducción y Diferenciación de callos a partir de Hipocótilos y Cotiledones de Repollo
(*Brassica oleracea* var. Royale Vantage) en cultivo *in vitro*

Por:

ULISES NERI CACHO

TESIS

Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito para obtener el
título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por:



M.C. Fidel Maximiano Peña Ramos
Presidente



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Secretario



Dra. Lihua Wei
Sinodal



Dr. Valentín Robledo Torres
Sinodal



M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Agosto 2022

DERECHOS DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.



Ulises Neri Cacho
Autor Principal



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Asesor Principal

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt). Por el financiamiento para la realización de este trabajo (proyecto A1-S-44946: Modificación genética de Crucíferas con genes inmunosopresores de Polydnavirus: Ampliando el método tradicional transgénico para protección de cultivos agrícolas de alto valor, FOSEC SEP-INVESTIGACIÓN BÁSICA).

A mi Asesor. El Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez, por todas las oportunidades, los consejos y el apoyo incondicional brindado durante el desarrollo de este proyecto. Le agradezco profundamente por toda la confianza que depositó en mí, la grandiosa amistad formada el paso de los años. Pero sobre todo el vínculo que formamos, y las grandiosas anécdotas vividas dentro y fuera del laboratorio. Sin duda un gran profesor e investigador. Gracias, por tanto.

A la Dra. Flor Cristina Pacheco Reyes. Por los sabios consejos y el conocimiento brindado y la gran paciencia que tuviste en el laboratorio durante las enseñanzas. Gracias por siempre estar ahí para escucharme. Muchas gracias por tu amistad.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Mi Alma Mater. La mejor casa de estudios por las grandes facilidades y oportunidades presentes para todos los jóvenes de cualquier parte de la República Mexicana. Brindando los mejores elementos para el éxito de los estudiantes. ¡Buitres por siempre!

Al Departamento de Botánica. Laboratorio de Zoología. Quienes me abrieron las puertas de una manera extraordinaria donde pude trabajar de la mejor manera de una manera teórica-práctica, donde pude adquirir nuevas habilidades y conocimientos durante todo este proceso para concluir mi licenciatura.

A mi Familia. Por el gran apoyo incondicional que me dieron, por todas aquellas pláticas motivacionales que hacían que siguiera adelante en mi carrera profesional. Les debo tanto y no me queda más que agradecerles. Mil Gracias.

A mis Compañeros de laboratorio. Araceli, Anel, Sofía, Mariel, Izsabella, Santiago y Hugo por su amistad y apoyo. Formamos un gran equipo. Gracias totales.

DEDICATORIA

«Poco a poco, uno viaja lejos»

(J.R.R Tolkien)

A mi madre, Anel Cacho Rivera. Por siempre esforzarte a que fuera un buen profesionalista, pero sobre todo una persona de valores. Gracias por demostrarme tu amor inconmensurable, por todo lo que hiciste por mí. Me faltarían palabras para agradecerte. Te amo, madre.

A mi padre, Omar Neri Torres. Por todos esos sabios consejos de vida que me diste, siempre los llevaré dentro de mí. No cabe duda de que eres mi ejemplo a seguir. Gracias a los esfuerzos que hiciste, hoy en día soy un gran profesionalista y por eso jamás en esta vida voy a parar de agradecerte. Te amo, padre.

A mi hermano, Omar Israel Neri Cacho. Por aquellas pláticas entre hermanos que terminaban en lágrimas, por no dejarme perder el camino cuando me encontraba fuera de él. A pesar de los problemas que tuvimos en la infancia, hoy agradezco el gran vínculo amoroso que formamos. Te amo, hermano.

A mis amigos, Diego Armando, Francisco Javier, Juan José, Juan de Dios, Luis Rodrigo y Brayan. Por la grandiosa amistad que formamos lo que llevó a convertirnos en una hermandad, por todas esas experiencias buenas y malas que vivimos. Sin ustedes no lo hubiera logrado. Con mucho cariño, para ustedes, mis mejores amigos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIA	III
ÍNDICE DE CONTENIDO	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. JUSTIFICACIÓN	3
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL	3
3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1. Antecedentes	4
4.2. Cultivo de repollo	4
4.2.1. Necesidades requeridas para el cultivo	6
4.3. Clasificación taxonómica	7
4.4. Descripción botánica del repollo	7
4.5. Cultivo de tejidos vegetales	8
4.5.1. Requerimientos generales del cultivo de tejidos vegetales	12
4.5.2. Estructura y utilidades	12
4.5.3. Cuarto de lavado	13
4.5.4. Sala de preparación de medio de cultivo	13
4.5.5. Cuarto de transferencia	14
4.5.6. Sala de crecimiento	14
4.5.7. Invernadero	14
4.5.8. Cuarto frío	15
4.6. Medios de cultivo	15

4.6.1.	Composición del medio de cultivo	15
4.6.2.	Nutrientes inorgánicos.....	17
4.6.3.	Nutrientes orgánicos	17
4.6.4.	Fuente de carbono.....	18
4.6.5.	Agentes gelificantes.....	18
4.6.6.	Agar.....	19
4.6.7.	Agarosa	19
4.6.8.	Gellan gum.....	20
4.6.9.	pH del medio de cultivo	20
4.7.	Cultivo de repollo <i>in vitro</i>	21
4.8.	Reguladores de crecimiento.....	21
4.8.1.	Auxinas.....	22
4.8.2.	Citoquininas.....	30
4.9.	Inducción de callos en plantas.....	39
4.10.	Regeneración de células vegetales.....	42
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
5.1.	Semillas de repollo.....	45
5.2.	Desinfección de semillas.....	45
5.3.	Germinación.....	46
5.4.	Obtención de explantes	46
5.5.	Inducción de callos	46
5.6.	Cuantificación de callos	47
5.7.	Regeneración de la planta.....	47
6.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	48
6.1.	Desinfección de semillas.....	48
6.2.	Inducción de callos	50
6.3.	Análisis de varianza.....	56
6.4.	Diferenciación de callos.....	58
7.	CONCLUSIÓN	60
8.	LITERATURA CITADA	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio de cultivo Murashigue y Skoog (MS).....	16
Tabla 2. Tratamientos de desinfección de semillas.....	45
Tabla 3. Concentraciones de reguladores de crecimiento por tratamiento.	47
Tabla 4. Porcentaje de germinación y de contaminación en el proceso de lavado.....	49
Tabla 5. Resultados por tratamiento y tipo de explante.....	56
Tabla 6. Análisis de la varianza para los promedios de callos por tratamiento, tipo de explante e interacción ($p<0.05$).....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de coles y sus diferentes formas.....	5
Figura 2. Repollo cultivado en la República Mexicana.....	5
Figura 3. Ramificaciones radicales y hojas adheridas al tallo leñoso.....	8
Figura 4. Cabeza de repollo en etapa final de desarrollo.....	8
Figura 5. Propagación de plantas <i>in vitro</i>	9
Figura 6. Estado totipotente de las células somáticas.....	10
Figura 7. Rutas biosintéticas de las auxinas.....	24
Figura 8. Estructura química del IAA.....	25
Figura 9. Estructura química del NAA	26
Figura 10. Mecanismo de regulación de la expresión de genes por auxinas	28
Figura 11. Estructura química de la quinetina	31
Figura 12. Rutas de biosíntesis de citoquininas.....	32
Figura 13. Estructura química del BAP.....	33
Figura 14. Callos de plantas producidos <i>in vitro</i>	39
Figura 15. Regeneración de una planta a partir de un callo.....	42
Figura 16. Desinfección de semillas de repollo.....	48
Figura 17. Explantes establecidos en medio de cultivo MS	51
Figura 18. Desarrollo de callos del tratamiento 4 en hipocótilos.....	52
Figura 19. Callos del tratamiento 4 con pelos radiculares y comienzo de diferenciación de las células.	53
Figura 20. Tratamiento 6 y 7 con presencia de raíz principal. A) Cotiledones – tratamiento 7, B) Hipocótilos – tratamiento 7, C) Hipocótilos – tratamiento 6.....	54
Figura 21. Comparación de medias (+/- error estándar) de los porcentajes de explantes con callos por tratamiento.....	57
Figura 22. Comparación de medias (+/- error estándar) de los porcentajes de explantes con callos por tipo de explante.	58
Figura 23. Callo con desarrollo de tallo y hoja.....	58
Figura 24. Callo diferenciado del tratamiento 4 (BAP, NAA y IAA).	59

1. RESUMEN

El repollo es una hortaliza de la familia de las Brassicaceas con gran importancia económica y agronómica. Esta planta se siembra en diferentes partes del planeta, debido a su alto contenido en nutrientes y sustancias benéficas para la salud humana. Actualmente el repollo se utiliza en estudios de transformación genética de plantas con el propósito de desarrollar nuevas variedades con mayor cantidad de nutrientes, resistencia a otros climas, etc. En el presente trabajo se busca desarrollar un procedimiento eficaz, empleando tres reguladores de crecimiento (BAP, NAA y IAA) para la formación de callos de hipocótilos y cotiledones, y determinar el potencial de regeneración de estos explantes en estado de callo. Cada cultivo de callos se subcultivará en medio nuevo o fresco con la misma mezcla de reguladores de crecimiento con el fin de iniciar la diferenciación de las células. Se utilizará la variedad *Royale Vantage* para la obtención de plántulas y posteriormente los explantes. La mayoría de los tratamientos utilizados en este experimento presentaron porcentaje de inducción de callo. Con ayuda de los reportes presentados por Bakhtiar et al., (2016), se confirma que el empleo de varios reguladores de crecimiento es más eficiente tanto para inducción como regeneración de los callos formados. En el tratamiento 4 se mezclaron los tres reguladores descritos, dando los mejores resultados en comparación a los demás tratamientos utilizados, concluyendo que si se mezclan más de tres reguladores de crecimiento aumenta el porcentaje de inducción y regeneración.

Palabras clave: Repollo, *Royale Vantage*, reguladores de crecimiento, transformación, explante, callo, hipocótilos, cotiledones, regeneración.

2. INTRODUCCIÓN

El repollo, una especie comúnmente conocida por sus polimorfismos, comprende un gran número de variedades de mucha importancia en el consumo humano. Las hortalizas que comprenden estas especies son el brócoli, col de Bruselas y coliflor y debido a su importancia nutricional son utilizados como sujetos de prueba para modificaciones biotecnológicas (Vinterhalter et al., 2007). Por esa razón comenzaron las investigaciones utilizando ingeniería genética de la familia *Brassicaceae*, lo que ha generado gran interés desde que los protocolos efectivos de regeneración y transformación se publicaron.

Debido a su susceptibilidad a enfermedades causadas por los hongos *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicola*, *Plasmodiophora brassicae* o *Phytium* spp. u otro agente causal de enfermedades, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales se han optado para la obtención de plántulas libres de fitopatógenos (Sretenović-Rajičić et al., 2007).

El uso de técnicas de regeneración empleando reguladores de crecimiento han demostrado ser muy útiles para la obtención de brotes o embriones, según sea el interés de los investigadores, ya sea la inducción de organogénesis o embriogénesis (Sparrow et al., 2004). Con respecto al repollo, los explantes que presentan mejor potencial de regeneración y los más utilizados incluyen los hipocótilos, cotiledones, raíces, hojas, segmentos del pedúnculo, incluso los callos y los cultivos de células pueden ser utilizados como explantes, capas de células delgadas, protoplastos y embriones cigóticos inmaduros (Kielkowska y Adamus, 2012).

Por otra parte, el estudio del potencial de regeneración de diferentes variedades de repollo es benéfico, en este estudio se presenta un protocolo para la inducción de callos y diferenciación de los mismos *in vitro* en explantes de hipocótilos y cotiledones utilizando reguladores de crecimiento, de la planta de repollo variedad *Royale Vantage*.

3. JUSTIFICACIÓN

En esta investigación se analizó el uso de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, específicamente auxinas y citoquininas, para establecer un protocolo para la inducción y la diferenciación de callos en dos tipos de explante, obtenidos de plántulas de repollo cultivadas *in vitro*. Además, la investigación contribuirá a diseñar y mejorar protocolos que favorezcan a la investigación con repollo. De este modo, se comprenderán los procesos fisiológicos y la interacción de los reguladores de crecimiento con los explantes de hipocótilos y cotiledones.

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

- Establecer un protocolo que permita la obtención de callos de repollo (variedad Royal vantage) y su diferenciación en condiciones *in vitro*

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar el mejor tratamiento antiséptico para semillas de repollo que serán cultivadas *in vitro*;
- Determinar cuál es el mejor explante para llevar a cabo la inducción de callos de repollo;
- Determinar la mejor concentración de reguladores del crecimiento para la inducción de callos de repollo;
- Determinar la mejor concentración de reguladores del crecimiento para la diferenciación de los callos de repollo.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Antecedentes

Brassica oleracea es una especie nativa de Europa, cabe mencionar que el broccoli, repollo, coliflor, col de Bruselas y colirrábano son plantas la misma especie. Gracias a la domesticación, la diferenciación de varias formas de especialización de diferentes órganos de las plantas ha surgido nuevos cultivos (Haynes et al., 2009). El origen del repollo se remonta a tiempos antes de cristo, en regiones del mediterráneo y los litorales de Europa Occidental. Esta planta era conocida como berza silvestre (*Brassica oleracea* var. *Sylvestris*) (Maroto Borrego, 2002). Fue domesticada por primera vez en Europa del Este por los romanos y los griegos, cuando cultivaban col rizada y repollo sin cáscara durante el Siglo I (Sauer, 1993). Posteriormente fue cultivada por los celtas y recibió el nombre de “Bresic”, ya que se piensa que fue un probable progenitor del actual género “*Brassica*”. Sin embargo, otros estudios demuestran el origen de un ancestro común de coles y repollo sin cáscara cultivados en Portugal, España y Francia (Agnola et al., 2003). (Agnola et al., 2003) también mencionan que la domesticación de esta planta ocurrió en China mucho antes de ser introducida a Europa.

4.2. Cultivo de repollo

El repollo es uno de los vegetales más cultivado alrededor del mundo. Es uno de los alimentos más importantes para el consumo humano debido a su importancia socioeconómica, ya que contiene grandes valores nutricionales, propiedades terapéuticas, entre otras características (de SOUZA, 1998). Cada cultivar de esta planta varia en tamaño, forma, color y textura de las hojas (figura 1) (Singh et al., 2006). De acuerdo con las estadísticas, cada año se consumen 7 kg de vegetales pertenecientes al género *Brassica* por persona en un hogar en el mundo (Schuller y Chelwing-Grzybowska, 2006). Asimismo, el repollo es consumido de diferentes maneras, por ejemplo, crudo, hervido, en ensaladas o en algunos casos fermentado.



Figura 1. Tipos de coles y sus diferentes formas

El repollo, contiene propiedades antioxidantes, antibacterianas y antiinflamatorio, y es usado como medicina tradicional contra enfermedades gastrointestinales (gastritis, úlceras, etc.), así como también en dietas para perder peso (Šamec et al., 2011).

De las especies vegetales pertenecientes a la familia Cruciferae, el repollo es la más importante de todas. Gracias a los avances genéticos tradicionales y la ingeniería genética se ha logrado mejorar esta planta, confiriéndole resistencia a otro tipo de latitud (figura 2), debido a que en condiciones nativas el repollo es cultivado en regiones donde las temperaturas son frías y templadas (Maroto Borrego, 2002).



Figura 2. Repollo cultivado en la República Mexicana

En los estados productores de la República Mexicana se ha reportado que se siembran aproximadamente 6270.3 has de repollo, siendo el Estado de Nuevo León el productor principal de esta hortaliza, seguido del Estado de Chiapas (Santiago-Lastra y Perales-Rivera,

2007). Las principales variedades sembradas en México son Blue Vantage y Royal Vantage, Bravo, Azurro F1, Escazu y San Juan, cada una procedente de diferentes casas comerciales o semilleras como lo son Syngenta, Sakata, Hm. Clause, entre otras. Sin embargo, para que la planta de repollo alcance su máximo desarrollo se requieren condiciones específicas (Zamora, 2016).

4.2.1. Necesidades requeridas para el cultivo

El rango óptimo de temperatura para el desarrollo de repollo está entre 15 y 18 °C. Si la temperatura alcanza un máximo de 25 °C el crecimiento de la planta es más lento, mientras que la temperatura mínima es de 0 °C. Sin embargo, las plantas después de su germinación pueden tolerar temperaturas frías y cálidas al igual que las plantas adultas. Algunas variedades de repollo logran tolerar temperaturas de hasta -10 °C. Toleran tanto bajas como altas temperaturas (Maroto Borrego, 2002).

El repollo puede adaptarse a suelos de tipo limo-arenosos a limo-arcillosos. También es ligeramente tolerante a pH ácidos de rango de 6 a 6.5. cabe mencionar que puede desarrollarse bien en suelos moderadamente arenosos y pesados. Aunque se recomienda que se cultive en suelos que retengan húmedas, fértiles, profundos y con un buen drenaje. Es importante mantener un buen pH con un rango óptimo de 6 a 6.5 para que no se presente una deficiencia nutricional y para que no haya un crecimiento tanto de hongos como bacterias (Maroto Borrego, 2002). Al igual que el pH, la salinidad debe mantenerse a un valor óptico de 2.8 dS/m, ya que puede llegar a evitar el crecimiento de la planta. El repollo es sensible a las sales con un valor de 1.8 dS/m, y cuando se cultiva en suelos arcillosos puede tolerar hasta 1.2 dS/m. Si se llega a cultivar en suelos muy arenosos puede tolerar 3.5 dS/m mientras que en suelos medios tolera 2 dS/m (Méndez Correa y Morfín Cartagena, 2006).

La planta requiere grandes cantidades de agua, sin embargo, durante la formación de cabeza se requieren aún más. Se puede regar utilizando aspersores durante la etapa de germinación. Cuando las plántulas comienzan a emerger, los cultivos pueden ser irrigados por medio de riego por goteo o riego por microaspersión, ya que este último es más usado en plantas crucíferas (Erie et al., 1982). Como cualquier tipo de hortaliza, la fertilización es una de las características más importantes durante el crecimiento de las plantas, debido a que

proporciona los nutrientes para obtener una buena producción. Dependiendo de la zona que cultive, esta planta ocupará diferentes fertilizantes, por ejemplo, en zonas del noreste donde la producción de repollo es escasa, se requiere fertilización con nitrógeno ya que los suelos contienen niveles bajos de este elemento (RAMIREZ CEPICIO, 1994) (Thompson et al., 2000). En el caso de la cosecha, el repollo se corta con un cuchillo lechuguero debajo de las hojas que cubren la cabeza. El corte se realiza de 120 a 150 días después de la siembra. Son empacados y encerados en la caja de cartón con un peso aproximado de 20 kg y 18 a 24 cabezas de repollo por caja (Lorenz y Maynard, 1988).

4.3. Clasificación taxonómica

De acuerdo con (Vigliola, 2010), el repollo tiene una clasificación taxonómica de la siguiente manera:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Capparales

Familia: Brassicaceae

Género: Brassica

Especie: oleracea

Variedad: Royal Vantage

4.4. Descripción botánica del repollo

El repollo es una planta bianual y pertenece a la familia de las crucíferas. La planta de repollo tiende a formar un tallo leñoso de tamaño corto y sin ramificaciones, contienen hojas modificadas adheridas al tallo y las mismas hojas definen que tan compacta es la cabeza del

repollo. Contiene raíces secundarias y su raíz principal es de forma cilíndrica y pivotante (figura 3) (Babula et al., 2007).



Figura 3. Ramificaciones radicales y hojas adheridas al tallo leñoso

El repollo posee un gran número de ramificaciones radicales demasiado finas y un gran número de pelos absorbentes, lo que la hace una planta con gran capacidad de absorción (Sarita Valdez, 1993).

En cuanto a la cabeza de repollo, está presente en el tallo que sostiene altos niveles de hojas no desplegadas, donde cada hoja está encima una de otra. Las hojas adultas rodean desde una yema terminal hasta las hojas más jóvenes, lo que le da su forma redonda característica (figura 4) (Fuentes y Perez, 2003).



Figura 4. Cabeza de repollo en etapa final de desarrollo

4.5. Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales es llamado de varios modos, cultivo *in vitro*, cultivo axénico o cultivo estéril es una de las herramientas más importantes en estudios tanto básicos y aplicados, aunque también es utilizado para motivos comerciales (Thorpe, 1990). En

términos generales el cultivo de tejidos vegetales es el cultivo de células, órganos, tejidos y sus componentes en condiciones *in vitro* (figura 5), es decir, manteniendo sus condiciones físicas y químicas.

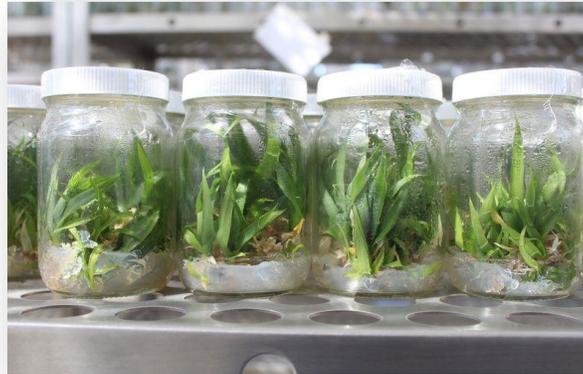


Figura 5. Propagación de plantas *in vitro*

Este término fue propuesto por Gottlieb Haberlandt de la Academia Alemana de Ciencias en el año de 1902 (Neumann et al., 2020). Además, propuso el término de “totipotencialidad” basándose en la teoría celular de Schleiden y Schwann (1839) e indicó que la técnica de cultivar células vegetales aisladas en soluciones nutritivas permite la investigación de problemas importantes en la planta con el propósito de continuar con la experimentación en un futuro (Kotte, 1922).

La totipotencialidad se puede interpretar de distintas maneras; una de ellas es la capacidad de desarrollar un organismo completo y la otra la capacidad de diferenciar en cualquier tipo de célula en un organismo. En el sentido estricto, solamente los cigotos o embriones son totipotentes. Haberlandt hipotetizó que la mayoría de las plantas pueden ser regeneradas a partir de células somáticas. Steward et al., (1958) demostró que los segmentos de tejido diferenciado de floema secundario de zanahoria pueden regenerar a la planta completa, destacando el potencial totipotente de las células somáticas (figura 6). De esta manera hubo evidencia experimental que apoyó la hipótesis propuesta por Haberlandt (Su et al., 2021).

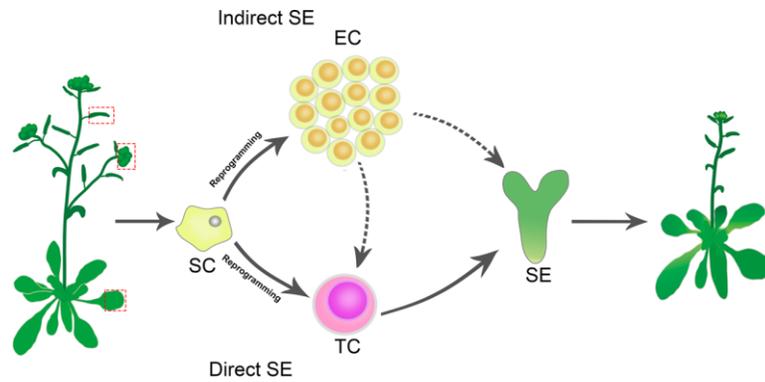


Figura 6. Estado totipotente de las células somáticas.

Fuente: Su et al., (2021).

Gautheret fue el primero en realizar un verdadero cultivo de tejidos vegetales utilizando el cambium de la planta *Acer pseudoplatanus*. También obtuvo resultados positivos con otras plantas tales como: *Ulmus campestris*, *Robinia pseudoacacia* y *Salix carpea* usando medio de cultivo sólido de Knop (Gautheret, 1939). Otras especies vegetales, como es el caso de *Nicotiana glauca*, fueron estudiadas realizando cultivos tumorales para la creación de un híbrido de dicha planta, *Nicotiana langsdorffii* (White, 1939), necesaria la adición que auxinas debido a que puede crecer en medio de cultivo sin ningún otro suplemento, incluso para diferenciar raíces y brotes (Nobécourt, 1939).

Con el paso del tiempo, se han incrementado las aplicaciones de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales para resolver varios problemas de diferentes áreas; como agricultura, horticultura, biología básica y forestales (Vasil y Thorpe, 2013).

(Hammerschlag et al., 1988), describieron un sistema que agrupa cinco etapas para el cultivo en sistema *in vitro*, que consisten en la selección de la especie, establecimiento del medio de cultivo, desarrollo del tejido, enraizamiento y acondicionamiento y aclimatación. Dichas etapas deben tomarse a consideración cuando se trata de realizar una investigación.

- i. Selección de la especie: al inicio del experimento, se deben presentar plantas con características especiales tales como plantas libres de patógenos, vigorosas y que sean estables en condiciones de clima extremo. De esta manera, se da inicio a la cadena de investigación.

- ii. Elección del medio de cultivo: la selección de un medio de cultivo adecuado es una parte fundamental en el desarrollo de experimentos *in vitro*. El medio básico o también llamado basal, empleado en la elaboración de medios de cultivo no puede fomentar el desarrollo de las células, por lo que es necesario buscar cambios con el propósito de conseguir respuestas en el crecimiento de un explante. Un medio de cultivo contiene carbohidratos, sales orgánicas e inorgánicas, vitaminas, reguladores de crecimiento y un agente gelificante. En casos especiales el agente gelificante no se añade en la formulación de medios de cultivo dependiendo del propósito de la investigación. También pueden añadirse otros compuestos como aminoácidos, retardantes, compuestos naturales y antioxidantes. Los compuestos que se añaden al medio de cultivo dependerán del tipo de explante que se utilice durante la investigación.
- iii. Desarrollo de los tejidos: es importante mencionar que los diferentes procesos de propagación *in vitro* requieren de un equilibrio de reguladores de crecimiento para lograr los resultados deseados sin alterar fisiológicamente el explante y así pausar el óptimo desarrollo de los mismos. Los procesos de desarrollo de tejidos incluyen la embriogénesis somática que consiste en la formación de embriones sin la fusión de gametos, la propagación clonal que no es más que la forma más común de multiplicación de especies vegetales, organogénesis, directa e indirecta, que es la formación de brotes a partir de un tejido de una planta, y la indirecta cuando se generan brotes a partir del desarrollo de callos previamente formados.
- iv. Acondicionamiento: el acondicionamiento de las plántulas en laboratorio tiene implicaciones en el monitoreo del fotoperiodo y la intensidad lumínica, temperatura y, generalmente, en respuestas fisiológicas. (Kamada y Harada, 1979) describieron la utilización de tres reguladores de crecimiento, los cuales son ácido 3-indol acético, ácido 2-(1-naftalén acético) y ácido indol butírico en concentraciones que van desde 0.1 a 5.0 mgL⁻¹. También sugieren reducir los niveles de nutrientes tanto macro como micro y aumentar los compuestos con aminoácidos y vitaminas.
- v. Adaptación: es la etapa final en el cultivo de tejidos vegetales, cuando las plántulas obtenidas *in vitro* son transferidas al exterior. Para lograr este propósito se debe de preparar a la plántula por medio del proceso de adaptación. Las plántulas que son

transferidas a campo son trasplantadas en sustratos estériles y en invernaderos, para prestar atención si ocurren cambios en los procesos fisiológicos (Perea Dallos et al., 2009).

4.5.1. Requerimientos generales del cultivo de tejidos vegetales

Para que el cultivo de tejidos vegetales tenga éxito, un laboratorio de investigación o de interés comercial debe contener ciertos instrumentos, reactivos y cuartos especializados para el almacenamiento y lavado, tales como almacenamiento y lavado de cristalería y plásticos, establecer un lugar para la preparación, esterilización y guardado de los medios nutritivos, así como también el establecimiento de una zona aséptica para la manipulación del material vegetal, incubadora para el mantenimiento de los cultivos bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad, y la observación de los cultivos desarrollados *in vitro* (Bhojwani y Dantu, 2013).

4.5.2. Estructura y utilidades

La infraestructura de un laboratorio donde se realice investigación en cultivo de tejidos vegetales debe tener al menos cuatro habitaciones:

- Cuarto de lavado del material utilizado;
- Cuarto de preparación de medios de cultivo;
- Área estéril para la manipulación del material vegetal;
- Cuarto de crecimiento o aclimatación para el mantenimiento de los cultivos en ambiente controlado.

Adicionalmente, el cuarto de crecimiento debe tener un microscopio estereoscopio y una buena fuente de luz de fibra óptica para la observación de los cultivos (Bhojwani y Dantu, 2013). Es importante que el laboratorio esté limpio y que el movimiento, ya sea de los cultivos del material vegetal o del medio de cultivo, sea delicado.

4.5.3. Cuarto de lavado

Dependiendo de la disponibilidad de fondos y espacio las áreas de lavado y esterilización deben estar separados o en una sala común. En tal caso, debe contener un adecuado suministro de agua caliente y fría, junto con un fregadero resistente a ácidos y alcalinos. El agua que se use idealmente debe contener una conductividad $5.0 \mu\text{mhos cm}^{-1}$ aunque si la conductividad incrementa a $15 \mu\text{mhos cm}^{-1}$ es aceptable. El agua se puede purificar mediante destilación, deionización o por ósmosis inversa. En ocasiones la combinación de dos o más métodos es necesario. El agua destilada o desionizada también puede usarse en laboratorios de enseñanza o para enjuagar el material, pero en el caso de una investigación y propósitos comerciales es necesario la instalación ya sea aparato de destilación para agua, una unidad de osmosis inversa o un sistema de ultrapurificación. Para un laboratorio de investigación una unidad de destilación de vidrio con una capacidad de 1.5 a 2 L h^{-1} es suficiente. La elección entre los sistemas dependerá en que tan pura se requiere el agua, la velocidad de producción y los costos. Incluso si hay agua de calidad disponible no puede ser usada para lavados finales del material utilizado o para la preparación, debido a que puede contener impurezas como compuestos inorgánicos y orgánicos, gases disueltos, partículas o microorganismos (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

4.5.4. Sala de preparación de medio de cultivo

Esta sala debe de estar equipada con una mesa cubierta con granito o con una lámina a modo de protección. También uno de los instrumentos más importantes que deben estar presentes es la balanza electrónica con capacidad de pesar largas cantidades y una balanza analítica para pequeñas cantidades de químicos. Un refrigerador con congelador incluido es indispensable para el almacenamiento de ciertos químicos, material vegetal y soluciones stock. Además, un potenciómetro con un solo electrodo que pueda leer conductividad debe ser proporcionado.

Para el caso de la esterilización por calor de los medios de cultivo se necesita una autoclave o una olla de presión doméstica, dependiendo de la cantidad de material que se requiera esterilizar. Como anexo, es importante tener a la mano un extintor de fuego y un kit de

primeros auxilios para cuando se presenten emergencias dentro del laboratorio (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

4.5.5. Cuarto de transferencia

En un laboratorio de investigación, las salas donde se transfieren las plántulas están dentro de la habitación de crecimiento o la de preparación de medios de cultivo, o incluso en otro lugar dentro del laboratorio. Aquí se ubican las cámaras de transferencia para manipular de manera aséptica las plántulas. Si se requiere transportar cultivos o medios de cultivo dentro o fuera del cuarto de transferencia el empleo de carritos con dos o más estantes son de gran ayuda. Si se emplea el uso de fuego o calor dentro de esta área, es importante mantener un extintor de fuego al alcance.

4.5.6. Sala de crecimiento

Este tipo de salas necesitan estar cerradas y además se requiere dispositivos de control de temperatura y luz. La temperatura es controlada por medio de aire acondicionado. Un aire acondicionado ayuda a mantener la presión de aire positiva. Estos aparatos deben mantener la temperatura a 25 ± 2 °C. Para temperaturas altas o bajas se requiere utilizar incubadoras especiales que proporcionen luz fluorescente. Los cultivos que se encuentren en etapa de crecimiento permanecen en un anaquel especial el cual puede ser movable o estable. Cuando se trata de realizar mantenimiento a los cultivos en diferente rango de fotoperiodo y temperatura es recomendable tener más de una sala de crecimiento (Perea Dallos et al., 2009).

4.5.7. Invernadero

Con el fin de continuar con el crecimiento de las plantas, las especies producidas *in vitro* se aclimatan en invernaderos elaborados de cristal, polietileno o policarbonato dependiendo del presupuesto. En ocasiones una autoclave en esta área se requiere para esterilizar el sustrato de las plántulas (Kumar y Loh, 2012).

4.5.8. Cuarto frío

Estas salas son usadas para mantener plantas a temperaturas que van de 2 - 4 °C para plantas de clima templado a 15 °C para plantas tropicales. Además, son usadas para romper la dormancia de las semillas o guardar medios de cultivos, mantener cultivos con plantas madre y plantas cosechadas (Mageau, 1991).

4.6. Medios de cultivo

Para la germinación, crecimiento de una planta, inducción de callos, brotes, raíces, etc., y regeneración de esta es necesario un medio de cultivo que contenga todos los nutrientes, vitaminas y suplementos necesarios que cumplan las necesidades de las plantas o el material vegetal (Gautheret, 1939).

La mayoría de los medios de cultivo desarrollados en el transcurso de los años, se basaron en la solución de sal de Knop (1865) y el medio de cultivo para algas desarrollado por Uspenski y Uspenska (1925). Los medios básicos más usados incluyen el medio MS (Murashige y Skoog), Linsmaier y Skoog (LS), Gamborg (B₅) y el medio de Nitsch y Nitsch (NN) (Torres, 1989).

4.6.1. Composición del medio de cultivo

Un medio de cultivo típico debe contener elementos minerales como fuente principal, tales como el potasio, calcio, magnesio, nitrógeno, fósforo y sulfuros; en grandes cantidades (macroelementos). También se requieren otro tipo de elementos (micronutrientes) en cantidades más bajas, como el hierro, manganeso, cobre, zinc, boro y molibdeno para el crecimiento de los tejidos (de Fossard, 1976). Cada elemento proporciona un factor activo en iones de otros tipos. Un tipo de ion puede contribuir en más de una sal en el medio de cultivo, es decir, los iones de NO₃ son contribuidos por NH₄NO₃ y por KNO₃, así como los iones de K son contribuidos por KNO₃ y por KH₂PO₄ (tabla 1). Sin embargo, existen otros compuestos presentes en los medios de cultivo como lo son las vitaminas y aminoácidos esenciales (George et al., 2008). Asimismo, Utami y Hariyanto (2020) reportan el uso de otros

compuestos que funcionan como caldos nutritivos de composición indefinida, por ejemplo, la leche de coco (CM), jugo de tomate (TJ), hidrolizado de caseína (CH), extracto de malta (ME) y extracto de levadura (YE).

Tabla 1. Composición del medio de cultivo Murashigue y Skoog (MS).

Ingredientes	Concentración (mgL ⁻¹)
Macroelementos	
Nitrato de amonio	1650.000
Cloruro de calcio	332.200
Sulfato de magnesio	180.690
Nitrato de potasio	1900.000
Fosfato de potasio monobásico	170.000
Microelementos	
Ácido bórico	6.200
Hexahidrato de cloruro de cobalto	0.025
Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
Sal disódica dihidratada EDTA	37.300
Sulfato ferroso heptahidratado	27.800
Sulfato de manganeso monohidratado	16.900
Ácido molíbdico	0.213
Yoduro de potasio	0.830
Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Vitaminas	
Myo-Inositol	100.000
Ácido nicotínico	0.500
Piridoxina HCl	0.500
Hidroclorato de tiamina	0.100
Aminoácidos	
Glicina	2.000

Total (grL ⁻¹)	4.4
----------------------------	-----

4.6.2. Nutrientes inorgánicos

También conocidos como macronutrientes, son aquellos que se requieren en cantidades con unidad de milimolar (mM). Los elementos que se encuentran en esta categoría son: calcio (Ca⁺²), potasio (K⁺), magnesio (Mg⁺²), nitrógeno (NO₃⁻), sulfuros (SO₄⁻²) y fósforos (PO₄⁻³) y cada uno de ellos son de suma importancia para la elaboración de un medio de cultivo para cultivo de tejidos.

Estos elementos son obtenidos a partir de compuestos, como es el caso del potasio y el calcio que provienen como KCl o KNO₃ y CaCl₂.2H₂O. Sin embargo, el nitrógeno se añade en forma de iones de amonio o nitrato (NH₄⁺ y NO₃⁻).

Existen otros nutrientes, también llamados micronutrientes, que son agregados al medio de cultivo en pequeñas cantidades y también son de gran importancia en los medios de cultivo. Por lo general, los micronutrientes tienen función como cofactores enzimáticos y los elementos que se encuentran en esta categoría son: boro (BO₃⁻³), manganeso (Mn⁺²), hierro (Fe⁺²), zinc (Zn⁺²), cobre (Cu⁺²), molibdeno (MoO₄⁻) y cobalto (Co⁺²). Cabe mencionar que el elemento hierro se le agrega un agente quelante como el EDTA para asegurar la viabilidad del ion hierro (Perea Dallos et al., 2009).

4.6.3. Nutrientes orgánicos

Así como se requieren nutrientes inorgánicos, también un medio de cultivo para tejidos vegetales requiere nutrientes orgánicos. Estos nutrientes se agregan al medio en forma de aminoácidos o vitaminas.

Algunas vitaminas actúan como coenzimas para el crecimiento de las plantas, donde las más importantes son aquellas pertenecientes al grupo B; viz, tiamina (vitamina B₁), ácido nicotínico (niacina o vitamina B₃), piridoxina (vitamina B₆) y myo-inositol. La concentración que se añade al medio de cultivo varía, de acuerdo con las necesidades de la planta.

De acuerdo a varias investigaciones, solo la tiamina y el myo-inositol son consideradas las vitaminas esenciales en la formulación de medios de cultivo para tejidos vegetales.

Mientras tanto, no se ha demostrado que los aminoácidos sean necesarios en un medio de cultivo debido a que se agregan en pocas ocasiones para que forme parte de la composición de un medio de cultivo (Abobkar y Ahmed, 2012). La glicina es el aminoácido más común encontrado en los medios, la L-glutamina, asparagina, serina y la prolina. Por lo general los aminoácidos funcionan como fuentes orgánicas de nitrógeno reducido. Sin embargo, la presencia de fuentes inorgánicas de nitrógeno, como el amonio, es suficiente para cubrir la necesidad de la planta, por lo tanto, no se requiere presencia de aminoácidos (Perea Dallos et al., 2009).

4.6.4. Fuente de carbono

Debido a la ausencia de fotosíntesis por falta de CO₂ y de intensidad de luz en los medios de cultivo no hay un intercambio adecuado de gases, por lo cual es necesario la adición de una fuente de carbono para la función de ciertas actividades metabólicas. La sucrosa es la fuente de carbono más utilizada en la formulación de medios de cultivo a una concentración de 2 % a 5% (peso / volumen). Se ha demostrado que la sucrosa esterilizada por autoclave con el medio de cultivo proporciona mejor crecimiento de los tejidos que la sucrosa filtrada para esterilización. Gracias a la esterilización por autoclave se presenta una hidrólisis de la sucrosa en azúcares de fácil asimilación por la planta, como lo son la glucosa y la fructosa. Cabe mencionar que no solo actúa como fuente principal de energía sino también como uno de los mayores componentes osmóticos del medio proporcionando el 50 % o más del potencial osmótico, mientras que las sales solo contribuyen de un 20 a 50 %.

En la formulación de medios de cultivo se pueden utilizar otras fuentes de carbono como lo son: la maltosa, galactosa, manosa y lactosa; cada una con beneficios diferentes (Bhojwani et al., 2013).

4.6.5. Agentes gelificantes

Uno de los elementos más importantes presentes en los medios de cultivo para tejidos vegetales son los agentes gelificantes. Cuando se utiliza un medio de cultivo líquido, los

explantes o el material vegetal tiende a sumergirse y morir a causa de condiciones anaeróbicas. Las características que debe tener un agente gelificante son:

- Que sea inerte
- Resistente a esterilización por autoclave
- Que sea líquido mientras está caliente

Con ayuda de los agentes gelificantes los explantes pueden mantenerse en la superficie y se mantienen aireados. Debido a que los agentes gelificantes provienen de organismos, por lo tanto, son productos biológicos, pueden contener contaminantes orgánicos e inorgánicos. Existen diversos agentes gelificantes los cuales los más destacados son el agar, la agarosa y Gellan gum (phytagel o Gelrite) (Kacar et al., 2010).

4.6.6. Agar

El agar es obtenido de un alga roja llamada *Gelidium amansii* y es la más común de los agentes gelificantes. Una de sus características es que es un polisacárido de alto peso molecular, formado por moléculas de galactosa, que puede unirse al agua. Además, que su firmeza está estrechamente ligada a la concentración de agar y el pH del medio de cultivo durante la esterilización por autoclave. Este agente gelificante solidifica a 45 °C y la concentración adecuada es de 0.8 a 1 % (p/v) (Debergh y Read, 1991).

4.6.7. Agarosa

Otro agente gelificante usado en la formulación de medios de cultivo es la agarosa, formada por moléculas de β -D (1-3) y 3,6-anhydro- α -L (1-4) galactopiranosas. Su obtención se basa en la purificación del agar eliminando agaropectinas con grupos sulfato. Es usado en una concentración de 0.4 a 1.0 %. A diferencia del agar la agarosa es más costosa y se funde a una temperatura de 30 °C. Sin embargo, la agarosa es adecuada para probar otros ingredientes durante la formulación de medios de cultivo que son termolábiles (Debergh y Read, 1991).

4.6.8. Gellan gum

Es un polisacárido lineal obtenido de la bacteria *Pseudomonas elodea* y distribuido por la casa comercial C.P: Kelco & Co., con el nombre “Gelrite” y por Sigma-Aldrich Chemical Co., con el nombre de “Phytigel”. Se ha convertido en un sustituto del agar y la agarosa en formulaciones de medios de cultivo debido a que no requiere calentamiento, sino que se puede preparar en soluciones frías. Una desventaja de usar este agente gelificante es que la concentración de cationes divalentes, tales como calcio y magnesio, debe estar estrictamente en rango a la concentración de Gellan gum para gelificar (Smith et al., 2007).

La concentración adecuada que debe añadirse durante la preparación de medio de cultivo es de 0.1 a 0.2%. También facilita la observación de semillas o cualquier otro material vegetal debido a que el gel tiene un color claro (Jain y Babbar, 2002). Cabe mencionar que, a diferencia de otro agente gelificante, la firmeza de gelificación no se ve afectada en un amplio rango de pH.

4.6.9. pH del medio de cultivo

El pH es una propiedad importante en la preparación de medios de cultivo debido a que tiene gran influencia en la asimilación de los nutrientes por parte del material vegetal, en la firmeza del agente gelificante (en caso de agar y agarosa) y la solubilidad de sales (Skirvin et al., 1986).

Generalmente, un medio de cultivo debe contener un pH de 5.8. Si el pH es mayor a 6.0 proporciona un medio con mayor dureza y un pH menor a 5.0 no permite la gelificación del agar debido a su hidrólisis durante la esterilización por autoclave. Después de la esterilización el pH disminuye de 0.3 a 0.5 unidades. Cuando se establece un tejido u otro material vegetal el pH cambia de unidad debido a la oxidación, por la asimilación de iones (como el NH_4^+ y NO_3^-) y por la secreción de sustancias por parte del explante (George et al., 2008).

4.7. Cultivo de repollo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de repollo ha sido reportado por varios grupos de científicos donde exploran diferentes tipos de explantes tales como protoplastos de mesófilo, microsporas, cotiledones e hipocótilos, raíces, ápices meristemáticos, yemas laterales, embriones androgénicos, embriones cigóticos inmaduros, peciolos y hojas (Chen et al., 2004; Sharma et al., 2014; Krzyżanowska et al., 2006; Pavlović et al., 2013; Daud et al., 2015). Para desarrollar el mejor protocolo de regeneración de repollo, se deben examinar diferentes factores importantes como el tipo de explante, edad de la planta, suplementación con reguladores de crecimiento, entre otros factores (Munshi et al., 2007).

Estudios realizados por Ravanfar et al., (2014) y Pavlović et al., (2013) demostraron que los callos obtenidos de hipocótilos presentan mayor eficiencia en regeneración de una planta en las subespecies *italica* y *capitata*. Adicionalmente, subcultivos de callos de hipocótilos no presentan altos niveles de regeneración de raíces (Gerszberg et al., 2015). Por otra parte explantes de hipocótilos contienen una respuesta morfogénica más rápida, en comparación a explantes de cotiledones (Ravanfar et al., 2014)

Cardoza y Stewart, (2004) mencionan que los explantes con edad de 3 a 5 días tienen los mejores resultados, en cuanto a regeneración, de varias especies de *Brassica*. Sin embargo, los explantes jóvenes obtenidos de plantas de 5 días de edad son demasiado pequeños para su manipulación. Por lo tanto, se ha optado por utilizar plantas de 10 días o más (Gambhir et al., 2017).

4.8. Reguladores de crecimiento

Las fitohormonas o reguladores de crecimiento pueden definirse como compuestos que afectan procesos metabólicos o de desarrollo en plantas superiores, comúnmente en concentraciones bajas. No contienen valores nutritivos para las plantas y no son fitotóxicas. Los reguladores de crecimiento están asociados al incremento o reducción del crecimiento de las plantas, a la floración, formación de frutos, madurez de frutos, defoliación y rasgos de calidad (Rademacher, 2015).

Existen 5 grupos principales de reguladores de crecimiento, auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico. Para la mayoría de las aplicaciones, las auxinas y citoquininas son las más importantes y comúnmente la concentración de reguladores de crecimiento se mide en mgL^{-1} (Baute et al., 2016).

Los reguladores de crecimiento son empleados en áreas encargadas de la producción de hortalizas como lo son la agricultura, horticultura y viticultura para obtener ventajas de los cultivos, principalmente ante la susceptibilidad a estrés biótico y abiótico. Mejoran la estructura morfológica de las plantas y los frutos, facilitan la cosecha, incrementa cualitativa y cuantitativamente la producción y modifica los componentes de la planta. De acuerdo con la literatura, se le atribuye a Neljubow (1901) como el primer descubridor de estos compuestos, que posteriormente se les acuñó el término como reguladores de crecimiento vegetal, en plantas superiores. Neljubow (1901) también demostró que el etileno causa crecimiento horizontal, inhibe la elongación y también causa hinchazón de la radícula en plántulas de guisantes (Bakshi et al., 2015). Mientras tanto, en los años 30's comenzó el uso comercial de los reguladores de crecimiento siendo el etileno y acetileno los primeros en usarse para inducir floración y formación de frutos de piña (Khan et al., 2020; Bartholomew, 2013).

4.8.1. Auxinas

Las auxinas son usadas con frecuencia en el cultivo de tejidos vegetales como una parte fundamental del medio de cultivo. Cuando se combinan con otros reguladores de crecimiento como las citoquininas regulan la dirección de la morfogénesis. A nivel celular, las auxinas controlan procesos básicos tales como el inicio de la división celular, formando meristemos dando origen a un tejido desorganizado o un órgano definido.

Cuando se trata de tejidos organizados, el efecto de las auxinas está involucrado en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad, y en plantas enteras se ha descrito que el efecto más marcado es el mantenimiento de la dominancia apical y la mediación de los tropismos (Friml, 2003).

Generalmente cuando se debe elegir que auxina utilizar y la concentración adecuada se deben tomar en cuenta ciertas características:

- Tipo de crecimiento y desarrollo
- El transporte del regulador de crecimiento hacia el tejido diana
- La inactivación, por oxidación y/o conjugación de la auxina en el medio y dentro del explante
- La sensibilidad del material vegetal a la auxina y de otras hormonas
- Los niveles naturales y la síntesis endógena dentro del explante
- La interacción entre las auxinas y las sustancias endógenas naturales

Las auxinas son levemente solubles en agua, pero demasiado solubles en solventes orgánicos como el etanol, metanol, acetona, éter dietílico, dimetil sulfóxido (DMSO), así como también en ácidos o soluciones de agua alcalinas.

La mayoría de las auxinas son estables a excepción del IAA (ácido indol-3-acético) y es especialmente sensible a la luz, principalmente a la luz UV, y a los oxidantes. Sin embargo, debido a su gran inestabilidad el IAA es la auxina menos efectiva que otras auxinas sintéticas como 2,4-D o NAA (ácido 1-naftalenacético).

4.8.1.1. Metabolismo de las auxinas

Su metabolismo consiste en dos caminos, biosintéticos y reacciones de modificación molécula-hormona. Las regiones donde se presentan con más frecuencia las reacciones biosintéticas son en regiones meristemáticas y órganos en crecimiento jóvenes tales como hojas de crecimiento rápido, desarrollo de inflorescencia, puntas de raíz y brotes apicales (Guilfoyle y Hagen, 2007).

Estudios realizados años atrás han afirmado que el aminoácido triptófano (Trp) es el precursor de las auxinas nativas más importantes en plantas y, de acuerdo con varias investigaciones, la ruta más común de biosíntesis de auxinas en plantas es la vía indolpiruvato, iniciando con la transaminación del triptófano catalizada por la enzima triptófano transaminasa (figura 7) (también llamada triptófano aminotransferasa). Después el indolpiruvato es transformado en indol-3-acetaldehído. Posteriormente, el aldehído obtenido da origen al IAA por medio de la deshidrogenación (con la enzima indolacetaldéhido

deshidrogenasa dependiente de NAD) o por medio de la oxidación (con la enzima indolacetaldehído oxidasa) (George et al., 2008).

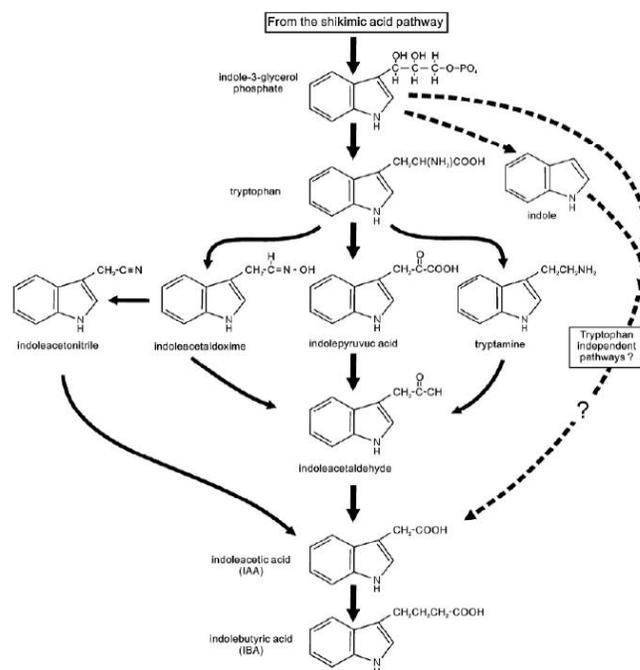


Figura 7. Rutas biosintéticas de las auxinas

Fuente: George, Hall, y de Klerk, (2008)

4.8.1.2. Ácido indol-3-acético (IAA)

El IAA (figura 8) fue la primera sustancia reconocida como una auxina y se ha encontrado en plantas superiores, y está involucrada o ligada a muchos procesos fisiológicos. Principalmente esta auxina participa en alargamiento celular, pero también se involucra en procesos morfológicos tales como la formación de raíces en diferentes especies de plantas (Patten y Glick, 2002).

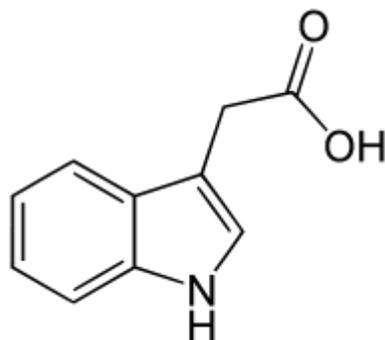


Figura 8. Estructura química del IAA

Fuente: Tran y Pal, (2014)

Los niveles de IAA son controlados mediante una peroxidasa, por lo que se ha propuesto que es el mayor mecanismo que controla los niveles y la acción de las auxinas. Por otra parte, desde que se descubrió que las giberelinas modulan la acción de auxinas a través de los niveles de oxidadas, definiendo que ambas fitohormonas (giberelina-auxina) tiene los efectos similares en la elongación celular. Cuando está presente en un medio de cultivo, el IAA vuelve frágil la pared celular de las células, debido a que comienza a modificarlas o también a dediferenciarlas (Galston y Dalberg, 1954). Sin embargo, se ha demostrado que la formación o disolución de conjugados de IAA como lo son la indoloacetilarabinosa, indoloacetilglucosa, myo-inositol y proteínas pueden controlar la cantidad de IAA presente en los tejidos (George, Hall, y de Klerk, 2008).

4.8.1.3. Ácido naftalenacético (NAA)

El NAA (figura 9) es un análogo del IAA que también es usado en los cultivos, con una estructura anillada modificada, pero con una cadena lateral similar a la de IAA. Además, el mecanismo de acción de este regulador es un poco similar al IAA, sin embargo, el NAA es mucho más estable que el IAA y por esa razón se ha convertido en un sustituto en sus aplicaciones biotecnológicas (Campanoni y Nick, 2005).

Debido a la inestabilidad del IAA, el NAA es usado para inducir callos tanto en gimnospermas como en angiospermas y es un buen sustituto de dicha sustancia debido a su gran resistencia a la oxidación. También se ha usado en la formación de brotes en especies

como *Pinus radiata*, *Picea abies*, etc., pero también inhibe esa formación de brotes en otras especies de plantas (Basuchaudhuri, 2016).

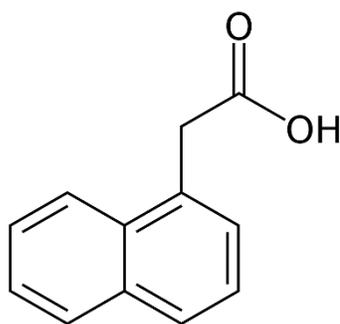


Figura 9. Estructura química del NAA

Fuente: (Tran y Pal, 2014)

Esta fitohormona no se encuentra naturalmente en las plantas, y es usado extensamente en el cultivo de tejidos. Aunque no está del todo claro cómo funciona su mecanismo de acción (Srivastava y Dwivedi, 2001).

4.8.1.4. Mecanismo de acción

Las auxinas son un componente especial en algunos sistemas presentes en plantas, como lo son los sistemas intraorganismo y los sistemas de señalización hormona-dependiente. En células vegetales aisladas se pueden distinguir dos procesos principales controlados por auxinas en colaboración con citoquininas, la división y el ciclo celulares, y la elongación celular (George et al., 2008).

La proporción auxina-citoquinina tiene un rol importante en la señal en la formación del fenotipo de la célula y también, tanto en el comienzo como el mantenimiento de los procesos de división celular (Stickens et al., 1996).

Los principales pasos en la señalización de una auxina (al igual que otros reguladores) pueden describirse como:

- Percepción inicial de una señal hormonal;
- Transducción de cascadas de señalización;
- Respuesta fisiológica final.

4.8.1.5. Percepción de señales

Se han identificado y caracterizado proteínas receptoras de auxinas, como la proteína ZmABP1 y la proteína receptora de auxina I en *Zea mays*, que son las proteínas presentes en mayor cantidad en membranas de maíz. Dichas proteínas existen en forma de dímeros con subunidades de 22 KDa (Hardtke et al., 2004) Algunos de los genes que codifican para la proteína receptora de auxinas (ABP1) han sido secuenciados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

4.8.1.6. Vías de señalización de transducción de auxinas

Existen diversos mecanismos de percepción o transducción tanto en animales como en plantas (Libbenga y Mennes, 1995). Hay indicadores que perciben las señales y son mediados por mecanismos basados en receptores de membrana, uno de ellos es la proteína heterotrimétrica G y la fosfolipasa A₂. (Scherer, 2002)

Se ha detectado que hay presencia de degradación de proteínas en la señalización de auxinas. Dicho mecanismo se basa en la regulación de la vía de conjugación de ubiquitina por auxinas (Calderon-Villalobos et al., 2010).

Sin embargo, se ha descrito que la degradación de proteínas mediada por ubiquitina es controlada por auxinas, por lo tanto, hay un rol multifuncional de regulación de auxinas durante el desarrollo de una planta (Dharmasiri y Estelle, 2004).

4.8.1.7. Regulación de la expresión genética

Los genes reguladores por hormonas específicas están involucrados en muchos procesos celulares como lo es la regulación hormonal, señales de transducción, metabolismo, transcripción, expansión y división celulares. También, estos genes se involucran en homeostasis hormonal y distribución en la retroalimentación transcripcional negativa. Asimismo, los conjuntos de genes de respuesta a auxinas incluyen algunos factores de transcripción necesarios para desarrollo de resultados, así como componentes de otras vías de señalización hormonal (Chapman y Estelle, 2009).

Se han identificado varias familias de genes en diferentes plantas y órganos, que se expresaron después de un tratamiento de esa planta u órgano con auxinas, y dichos genes fueron llamados Aux-IAA, GST (glutación-S-transferasa), SAUR (pequeños RNAs reguladores de auxinas), ACC sintasa (ácido aminociclopropano carboxílico), genes GH3, entre otros (George et al., 2008). Cabe mencionar que la mayoría de los genes de respuesta a auxinas fueron identificados, así como descritos por Baulcombe y Key, (1980) en hipocótilos de frijol.

Las principales familias de genes involucradas en el control de la transcripción por auxinas son: factores de respuesta de auxinas (ARF), los cuales pueden unirse a los elementos de respuesta de las auxinas dentro de los genes sensibles a auxinas y las proteínas represoras Aux/IAA (figura 10) cuya expresión está regulada por auxinas (Dharmasiri y Estelle, 2004).

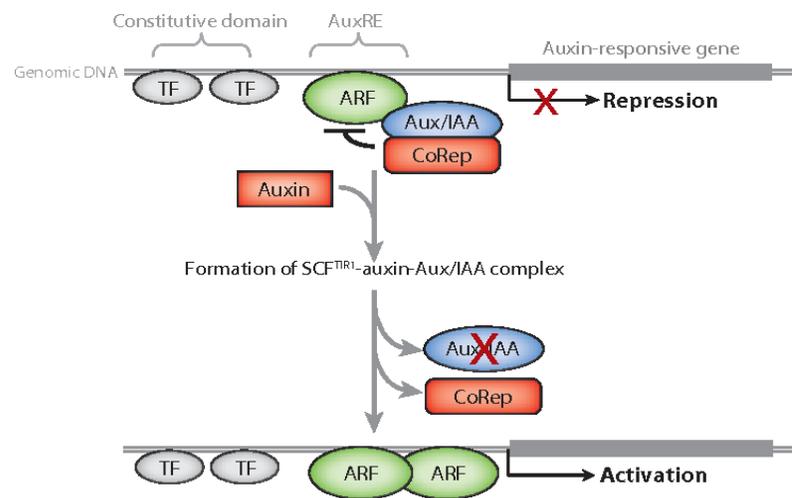


Figura 10. Mecanismo de regulación de la expresión de genes por auxinas

Fuente: (Chapman y Estelle, (2009)

Los ARFs pueden formar dímeros con las proteínas Aux/IAA y en esta forma combinada no pueden activar la expresión de genes relevantes. A altas concentraciones de auxinas, los complejos ARF-Aux/IAA se disocian y posteriormente son ubiquitinados, después los ARFs activan la transcripción (Wilmoth et al., 2005).

4.8.1.8. Efectos en el cultivo de tejidos

En un cultivo de tejidos, el cambio de concentración de auxinas presentes en el medio de cultivo puede cambiar el tipo de crecimiento, por ejemplo, la formación de raíces puede cambiar a inducción de callos. De este modo, cada cultivo es único y el efecto de diferentes concentraciones de auxinas debe ser probado en cultivos individuales, y hasta cierto punto los cultivos pueden ser transferidos a otros medios de cultivo.

4.8.1.9. Crecimiento en callos inducidos

Durante la inducción de callos, se requiere que se agreguen auxinas al medio de cultivo. La aplicación de auxinas es capaz de alterar la fisiología programada de todos los tejidos vegetales. Las células responden a las auxinas comenzando a desdiferenciarse e iniciando la división celular. LoSchiavo et al., (1989) describió que las auxinas causan una inusual metilación en la estructura del DNA, por lo tanto, esto puede ser necesario para reprogramar la diferenciación de las células.

Sin embargo, los programas específicos de los tejidos asociados con la diferenciación pueden ser erradicados a causa de una hipermetilación, con pequeñas fracciones de células alcanzando el estado final de desdiferenciación, la cual las vuelven capaces de iniciar el proceso de morfogénesis o embriogénesis (Terzi y Loschiavo, 1990). La auxina usada con más frecuencia en cultivos para inducir callos es la 2,4-D. Los explantes que comienzan la inducción de callo, tienden a reducir la producción de clorofila cuando hay presencia de 2,4-D en el medio de cultivo.

4.8.1.10. Cultivo de órganos vegetales

Es importante seleccionar la concentración adecuada de auxinas que promoverá el crecimiento del órgano sin la necesidad de inducir callo. Los bajos niveles de auxinas es benéfico en conjunción con altos niveles de citoquininas cuando se requiere multiplicación de raíces, aunque en algunos casos el empleo de una citoquinina sola es suficiente (Perera et al., 2009)

Mientras tanto, la rizogénesis requiere un ajuste en los niveles de concentración tanto de auxinas como de citoquininas. Si se trata de la formación de raíces laterales, el empleo de la auxina IBA es más efectivo que NAA (Kim et al., 2007).

Cabe mencionar que en ocasiones los tejidos, órganos y células pueden crecer sin la necesidad de añadir auxinas al medio de cultivo y son llamados “cultivos autónomos de auxinas” (Han et al., 2014)

4.8.1.11. Embriogénesis

A comparación de otros procesos, la embriogénesis somática es iniciada cuando el medio contiene altos niveles de auxinas, especialmente de 2,4-D, aunque si se reduce la concentración de auxinas los embriones no podrán desarrollarse más. (Sharp, 1980) propuso que las auxinas logran inducir una determinación embriogénica en una porción de células en callos o de cultivos en suspensión, pero al mismo tiempo dichas células inducidas facilitan el desarrollo de embriones (Pasternak et al., 2002).

4.8.2. Citoquininas

Las citoquininas comprenden una clase separada de sustancias reguladoras de crecimiento debido a que tienden a producir varios efectos cuando se aplican a plantas intactas. A veces simulan la síntesis de proteínas y participan en el control de la división celular. De esta manera las citoquininas promueven la maduración de cloroplastos y logran retrasar la senescencia de las hojas. El efecto de estos reguladores es más notorio cuando se aplica a un cultivo de tejidos vegetales y en conjunto con las auxinas estimulan tanto la división celular como el control de la morfogénesis.

Los ejemplos de citoquininas usadas en cultivo de tejidos vegetales son: trans-zeatina (4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilaminopurina), iP (N^6 - Δ^2 iso-penteniladenina) y dihidrozeatina (6-(4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenil). Algunas de las citoquininas identificadas están relacionadas estructuralmente con la kinetina (figura 11) (la primera citoquinina descubierta), las cuales se han encontrado como bases libres, es decir, como glucósidos, ribósidos o nucleótidos (Hentsch et al., 1996).

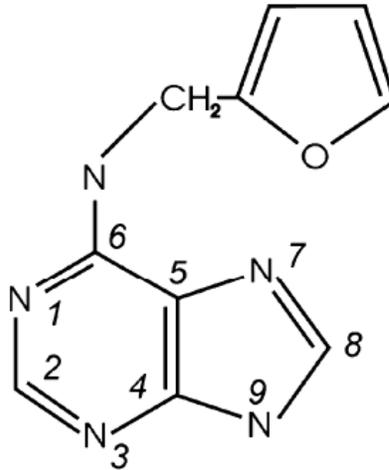


Figura 11. Estructura química de la quinetina

Fuente: Tran y Pal, (2014)

4.8.2.1. Biosíntesis

Las citoquininas se presentan como moléculas libres dentro de la planta, también se encuentran en los tRNA del citoplasma y cloroplastos. Chen et al., (1985) describió que, en la mayoría de las plantas, las raíces son los lugares con mayor presencia donde se realiza la biosíntesis de citoquininas naturales, aunque la producción de este regulador de crecimiento también toma lugar en otro tejido en crecimiento activo (George et al., 2008).

Las circunstancias que llevan al descubrimiento de las citoquininas y su participación en la división celular y en la síntesis de proteínas, se ha pensado que están estrechamente asociadas con los ácidos nucleicos (Frébert et al., 2011). Se han elaborado estudios donde se menciona que la predominancia de cis-isómeros de zeatina en ciertas especies de plantas son sintetizados en una ruta directa independiente de la degradación de tRNA (Jameson, 2000). Se han descrito tres procesos de biosíntesis de citoquininas isoprenoides (figura 12) presentes en plantas. Inicialmente se pensaba que el tRNA era la principal fuente de citoquininas libres. Posteriormente, esa hipótesis se refutó debido a que se demostró que existía una ruta directa donde no se involucraba la degradación de tRNA. Sin embargo, un segundo precursor de la cadena lateral, otro que isopentenil pirofosfato (IPP), se ha sugerido para la síntesis de trans-zeatina-ribosido monofosfato (ZMP) y puede ocurrir independiente

económico, disponible en el mercado y muy efectivo. Se ha reportado que puede formar callos, aunque su uso más importante es promover la formación de brotes. Cabe mencionar que es uno de los reguladores de crecimiento más potente para estos propósitos (Carimi et al., 2003).

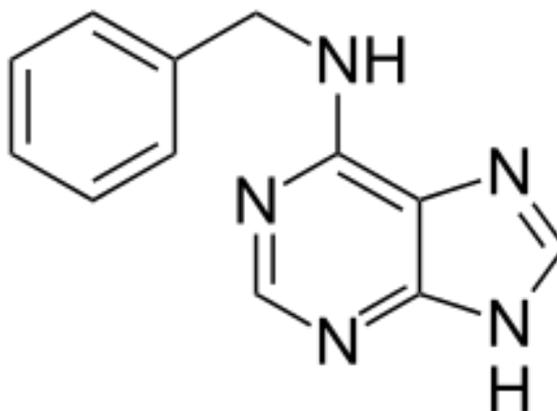


Figura 13. Estructura química del BAP

Fuente: Tran y Pal, (2014)

En algunos casos la formación de raíces permite la formación de brotes cuando se reduce la concentración de BAP (10 veces o más) o simplemente se elimina del medio de cultivo. Alternativamente, los propios tejidos pueden sintetizar sus propias citoquininas sin necesidad de agregar una sustancia exógena. Si se añade una citoquinina exógena, puede haber un desequilibrio, y por lo tanto la morfogénesis puede tomar otra dirección e incluso iniciar otro proceso que no es de interés (Verma et al., 2009).

La mayor razón de la eficacia del BAP reside en la capacidad de los tejidos vegetales para metabolizar las fitohormonas naturales más rápidamente que los reguladores de crecimiento artificiales. Algunas investigaciones mencionan que el BAP puede inducir la producción de citoquininas naturales como la zeatina dentro de los tejidos y así trabajar a través de un sistema hormonal natural para inducir el proceso de organogénesis (da Silva, 2012).

4.8.2.3. Mecanismo de acción

Las citoquininas juegan un papel muy importante en el control del desarrollo de una planta. La acción de este regulador de crecimiento es dependiente de la luz azul, roja y blanca. En

algunas plantas, la luz, incrementa la proliferación de brotes y se debe a la fuerte dependencia de un rango de fluencia de fotones. En conjunto con las auxinas, este regulador de crecimiento forma parte en la regulación de la división celular. Por otra parte, se ha concluido que el conjunto auxina-citoquinina probablemente induce la ciclina tipo-D (CycD3) y también estimula el progreso del ciclo celular desde la fase G1 hasta la fase S, aunque algunos autores describen que también puede simular hasta la fase de transición G2/M mediante la inducción de la expresión del gen *CDC2* que codifica para la enzima histon-H1-kinasa y simula la desfosforilación del Cdc25 (ciclo de división celular 25A) (Pasternak et al., 2002); den Boer y Murray, 2000).

Algunos derivados de citoquinina como lo es la olomoucina, roscovitina y la bohemina tienen la capacidad de inhibir las enzimas kinasas dependientes de ciclina de tipo 1 y tipo 2, y como consecuencia también inhiben o bloquean el ciclo celular en la fase de transición G1/S y G2/S (Planchais et al., 2004).

4.8.2.4. Control de la fase de transición G₁/S

Durante el ciclo celular, el complejo CDKA/CYCD (ciclina dependiente de kinasa A-1/ciclina D) promueve el inicio de la fase S mediante la fosforilación de la proteína RBR (retinoblastoma), la cual tiene la función de inhibirse de la familia E2F (factor E2) de los factores de transcripción. Estudios realizados en *Arabidopsis* mencionan que la expresión de tres genes *CYCD3;3* (ciclina-D3-3) es inducida por la acción de citoquininas en un tratamiento con tiempo de 20 horas. Sin embargo, la sobreexpresión de del gen *CYCD3;1* (ciclina-D3-1) sobrepasa los requerimientos de concentración de citoquininas para la formación de un callo verde a partir de callos de células desdiferenciadas y la ruptura de uno de los genes bloquea la habilidad de la citoquinina de promover la formación de brotes de callos cultivados *in vitro*, por lo tanto, el gen *CYCD3* (ciclina-D3) es un blanco clave para las citoquininas para su regulación del ciclo celular (Schaller et al., 2014).

4.8.2.5. Control de la fase de transición G₂/M

Tanto en animales como en plantas el control de la fase de transición G₂/M es promovido por la fosforilación de las proteínas CDK (quinasas dependientes de ciclina). Dicha fosforilación inhibe la actividad de los CDKs y es invertida por la enzima CDC20 fosfatasa. Estudios e investigaciones han dado como resultado que la biosíntesis de citoquininas es un elemento esencial para la transición de G₂/M en sincronización con las células. Los niveles de citoquininas, especialmente de la zeatina, oscilan en el transcurso del ciclo celular con un alza al final de la fase S y durante el inicio de la mitosis.

Mientras tanto, una sobreexpresión de un gen *cdc25* de *Schizosaccharomyces pombe* en plantas de tabaco tuvo como resultados positivos en cuanto a efectos de citoquininas (Schaller et al., 2014).

Mientras tanto, resultados de investigaciones sugieren que las citoquininas juegan un papel importante en la regulación de la transición de la fase G₁/M, y un punto principal de control de este regulador de crecimiento en el ciclo celular puede ser la transición de la fase G₂/M (Lipavská et al., 2011).

4.8.2.6. Metabolismo

El metabolismo de las citoquininas es muy complejo y generalmente consiste en la conversión entre bases de citoquininas, ribósidos y ribótidos, y sobre todo reacciones de conjugación y degradación (Ördög et al., 2004). Una enzima natural, citoquinin oxidasa, degrada a las citoquininas tales como la zeatina y la isopenteniladenina, los cuales contienen un doble enlace Δ^2 , cortando su cadena lateral. Algunas otras moléculas como los nucleótidos de citoquininas, entre otras, no son sustrato para dicha enzima. En la aplicación en el cultivo de tejidos, la actividad de esta enzima es potenciado por la aplicación de citoquininas exógenas. De esta manera, los tratamientos de plantas con citoquininas sintéticas reducen los niveles de compuestos endógenos naturales (Motyka y Kamínek, 1990).

Otras investigaciones reportaron que existe otra enzima responsable de la degradación de la quinetina y benziladenina a adenina. Sin embargo, esta reacción de degradación ocurre de manera diferente en varias plantas, por ejemplo, en cultivos de *Gerbera* se reportó que la

cadena lateral es hendida. Mientras que en cultivos de *Prunus domestica* después de 21 días con tratamiento de esta enzima, ocurre esta reacción de degradación (Armstrong, 2019).

4.8.2.7. Efecto en el cultivo de tejidos vegetales

En el cultivo de tejidos vegetales, las citoquininas son sumamente necesarias para la división celular. En ausencia de esta fitohormona la metafase es considerablemente prolongada debido a que se requiere para regular la síntesis de proteínas involucradas tanto en la formación como la función del huso mitótico. Mientras tanto, los cultivos donde se administran bajas concentraciones de esta hormona la división del núcleo de la célula se detiene en una etapa del ciclo celular (Ngomuo et al., 2013).

En cultivos de callos donde la división puede ocurrir sin la presencia de citoquininas en el medio de cultivo, son capaces de producir sus propias sustancias naturales de crecimiento, las cuales pueden aislarse. Durante el proceso de proliferación de callos obtenidos de tejidos de plantas dicotiledóneas, usualmente se emplea una combinación de citoquininas y auxinas en el medio de crecimiento. Sin embargo, el proceso de proliferación no ocurre de manera similar en todas las plantas, por ejemplo, en plantas de tabaco la proliferación solo se presenta cuando se suplementa el medio de cultivo con citoquininas y auxinas sintéticas, en ese orden y de manera consecutiva (Ozden y Karaaslan, 2011).

4.8.2.8. Embriogénesis

Una concentración de aproximadamente 0.5 – 2.5 μM es baja, por lo tanto, es adecuada para la inducción de callos embriogénicos, especialmente en plantas de hoja ancha. Varios estudios han reportado que las citoquininas pueden inhibir el proceso de embriogénesis en plantas monocotiledóneas, por ejemplo, una concentración de mínimo 0.001 μM de una citoquinina exógena es suficiente para prevenir dicho proceso en la planta *Dactylis glomerata* (Su et al., 2015).

Se han realizado estudios con citoquininas endógenas y se han obtenido resultados donde mencionan que las sustancias endógenas son responsables de inhabilitar el proceso de embriogénesis en algunos genotipos. Algunas secciones de hojas obtenidas de variedades no

embriogénicas contienen bajos niveles de citoquinina natural, a diferencia de aquellos que son capaces de inducir callos embriogénicos. Carman et al., (1988) realizaron experimentos induciendo embriogénesis en diferentes variedades de trigo cortando sus espigas antes de cultivar los explantes embriogénicos inmaduros. Pensaban que haciendo estos cultivos disminuiría el suministro de citoquininas naturales de las raíces. De esta manera, si la zeatina se añadía al medio de cultivo, el proceso de embriogénesis se reprimía.

4.8.2.9. Cultivo de brotes

Otro de los usos que tienen las citoquininas es en la proliferación de brotes axilares, formación de brotes adventicios y la inhibición de formación de raíces. El uso de una o más citoquininas aumenta el crecimiento de brotes axilares y reduce la dominancia apical en los cultivos de hojas anchas. Un tratamiento exitoso con altos niveles de citoquininas induce el crecimiento de pequeños brotes de cada explante, además de producir muchos de estos brotes, en un periodo tiempo aproximado de 4-6 semanas. Por otra parte, si se usa una concentración de $0.5 - 10 \text{ mgL}^{-1}$ de citoquininas generalmente inhibe o retrasa la formación de raíces y no solo previene el crecimiento de estas, sino también los efectos de las auxinas durante el desarrollo de las raíces (Grzegorzczuk-Karolak et al., 2015).

4.8.2.10. Percepción y transducción de señales

Las vías de señalización de las citoquininas involucran cuatro procesos de fosforilación alternos entre residuos de histidina y aspartato. Esta fosforilación hace uso de un receptor “híbrido” HK que contiene tanto la enzima histidina quinasa y los dominios del receptor, auténticas histidinas fosfotransferasas (AHPs) y reguladores de respuesta (RRs). Los diferentes elementos de señalización de citoquininas en *Arabidopsis* y otras plantas son codificadas por familias de genes con funciones de superposición (Nongpiur et al., 2012; Pils y Heyl, 2009).

Los receptores de HK de citoquinina tienen un dominio conservado de unión de citoquinina extracitosólico CHASE (ciclasas/histidina quinasa asociadas con detección extracelular), al menos dos dominios transmembranales, una región citosólica que contiene un dominio de

histidina quinasa un dominio receptor canónico y un dominio receptor divergente con poca probabilidad que funcione en la fosfotransferencia (Higuchi et al., 2004). Primero los receptores HK localizan la membrana del retículo endoplasmático, con el dominio CHASE orientado en el retículo endoplasmático, sugiriendo que el sitio de unión de las citoquininas en las plantas es en el lumen del retículo endoplasmático. Gracias a diferentes análisis bioquímicos se pudo determinar en qué fracciones de la membrana se encuentran los sitios de unión de citoquinina con alta afinidad (Lomin et al., 2011; Wulfetange et al., 2011).

Las citoquininas unidas a los dominios CHASE resultan en la activación del dominio citosólico de quinasa histidina y la autofosforilación en los residuos conservados de His, y es seguido por la transferencia de un grupo fosfato hacia un Asp conservado dentro de un dominio receptor (Yamada et al., 2001). Posteriormente, el grupo fosfato es transferido río abajo a las proteínas histidina fosfotransferasa y los reguladores de respuesta de tipo B formando un circuito regulador positivo en el cual la señal de transducción resulta en un cambio transcripcional en el núcleo (Hwang y Sheen, 2001).

4.8.2.11. Interacción auxina-citoquinina

Skoog y Miller (1957) descubrieron que la formación de brotes puede ser inducida a partir de callos de una planta usando leves relativamente bajos de auxinas y niveles altos de citoquinina en el medio de crecimiento. A partir de estos descubrimientos, se han encontrado muchos aspectos de la diferenciación celular y la organogénesis tanto en cultivo de tejidos como de órganos, debido a la interacción que existe entre las concentraciones de citoquininas y auxinas.

Sin embargo, proporciones relativas de auxinas y citoquininas no siempre produce buenos resultados en el cultivo de tejidos, por ejemplo:

- ❖ En algunas especies de plantas, la proliferación de brotes axilares es promovida por la presencia de auxina y citoquinina;
- ❖ Los tejidos de especies monocotiledóneas pueden inducir callos con altos niveles de auxina sin la presencia de citoquininas;

- ❖ El proceso de organogénesis en monocotiledones es promovido por la transferencia del cultivo a un medio sin auxinas, pero reduciendo las concentraciones de una auxina altamente activa como la 2,4-D u otra auxina como la IAA o NAA.

Por otra parte, la concentración de cada regulador de crecimiento difiere acorde al tipo de planta, las condiciones del cultivo y sobre todo los compuestos usados. Cabe mencionar que este tipo de interacciones son muy complejas y la combinación de dos o más sustancias reguladoras de crecimiento dan resultados óptimos en los cultivos (Su et al., 2011).

4.9. Inducción de callos en plantas

Las células vegetales tienen la capacidad de generar masas de células desorganizadas llamados “callos” o “tumores” (figura 14), en respuesta a factores de estrés como una infección por fitopatógenos o una simple herida. El término “callo” tiene origen del latín *callum*, que significa duro. En medicina se refiere al engrosamiento del tejido dérmico y en la biología de las plantas se refiere al crecimiento masivo de las células y la acumulación de callosidades asociado con heridas. Un callo puede producirse de una simple célula dediferenciada, y muchos callos de células son totipotentes (Sugiyama, 2015; Fehér, 2019).



Figura 14. Callos de plantas producidos *in vitro*

Fuente: Mishra et al., (2015)

Existen diferentes variedades de callos, por lo que se han clasificado en subgrupos basándose en sus características macroscópicas, por ejemplo, un callo sin un órgano regenerado es

llamado callo “friable” o “compacto”. Mientras que, si un callo muestra varios grados de un órgano regenerado se denomina “rooty”, “shooty”, o callo “embriogénico”, dependiendo de los órganos que ha generado (Sharan et al., 2014). Ikeuchi et al., (2017) menciona que también se conocen diferentes tipos de callos en *Arabidopsis thaliana* y que cada tipo tiene un perfil de expresión de genes distinto. Cabe mencionar que las plantas están equipadas con mecanismos para prevenir una inducción de callos no requerida para mantener organizados los tejidos. Después de que se descubriera que los callos se pueden generar artificialmente *in vitro*, y que el balance entre dos fitohormonas (auxina y citoquinina) determina el estado de diferenciación y dediferenciación, los callos se han utilizado en investigación básica y en aplicaciones industriales (Ikeuchi et al., 2013).

4.9.1. Aspectos moleculares en la formación de callos

Se han identificado mutantes deterioradas durante la formación de callos y los análisis genéticos de esas mutantes indican que la inducción de los callos pasa a través de complejos mecanismos de regulación. La progresión del ciclo celular mitótico es bloqueando en células vegetales diferenciadas en etapa terminal. La activación de un solo regulador del ciclo celular, tales como las ciclinas (CYC) o las enzimas quinasas dependientes de ciclina (CDKs), no es suficiente para lograr iniciar el proceso de inducción de un callo (Vieira et al., 2014).

La mayoría de los procesos que describen la inducción de un callo emplean regulaciones transcripcionales o postranscripcionales que causan grandes cambios en la expresión o traducción de una proteína (Sugimoto, 2015).

4.9.2. Formación *in vitro* de callos

La aplicación de auxinas y citoquininas exógenas inducen callos en varias especies de plantas. Una proporción alta de auxina-citoquinina o citoquinina-auxina induce regeneración de raíces y brotes, respectivamente. Desde este descubrimiento, el sistema de regeneración se ha usado en la propagación de rasgos económicamente importantes de las plantas y en la introducción de transgenes deseados a las plantas. Sin embargo, otras fitohormonas como los

brasinoesteroides o el ácido abscísico también logran inducir callo y en algunas especies pueden sustituir la aplicación tanto de auxinas y citoquininas (Yang et al., 2018).

Se ha demostrado que los reguladores de crecimiento en el desarrollo de la raíz lateral participan en la formación del callo. Una auxina es un inductor de la raíz lateral y algunos miembros de la familia del dominio LBD (límites de los órganos laterales, o también conocidos como hojas asimétricas) de factores de transcripción, como lo son LBD16, LBD17, LBD18 Y LBD29, regulan esta respuesta río abajo del factor de respuesta a auxina (ARF7) y el ARF19 (Cucinotta et al., 2014).

Los LBD18 y LBD33 son activados y forman un heterodímero, activando la expresión del factor de transcripción promotor del factor de unión E2a (E2Fa). Este factor de transcripción es uno de los seis factores que al dimerizar con la proteína DP (dimerization partner) inicia la transcripción de genes requeridos para la replicación del DNA. Una mutación en E2Fa impide el desarrollo de la raíz lateral, por lo que la vía ARF-LBD-E2Fa define un mecanismo de como las plantas traducen la señalización de una auxina en un control del ciclo celular (Vieira et al., 2014).

4.9.3. Procesamiento del RNA y traducción de proteínas

Los procesos de dediferenciación y diferenciación también involucran cambios masivos en la expresión de genes que alteran a nivel celular dichos procesos. El gen SRD2 (shoot redifferentiation defective2) codifica para una proteína nuclear que tiene una secuencia similar al gen humano SNAP50, una proteína requerida para la transcripción de RNAs pequeños nucleares (snRNA). Los mutantes del gen *srd2* son incapaces de transcribir los snRNA en condiciones restrictivas de temperatura, por lo tanto, estos defectos alteran la formación de callos de explantes de hipocótilos (Ohtani et al., 2015). Los snRNA tienen función en el splicing del RNA como componentes del spliceosoma, además, la producción mediada por SRD2 de snRNA es esencial para un splicing de pre-mRNA durante la formación de callos.

Estudios realizados por Skalák et al., (2019) menciona que hay una elevación en la transcripción de rRNA durante la inducción de callos por medio de hormonas en explantes de hojas de tabaco. Mientras que Ohbayashi y Sugiyama, (2018) reportan una acumulación

de precursores de rRNA en el inicio de la inducción de callos en explantes de hipocótilos de *Arabidopsis*, infiriendo en la biogénesis activa de rRNA en la inducción.

Una mutación en la proteína RID2 (proteína similar a la metiltransferasa localizada en el núcleo) impide la formación de callos a cierta temperatura y estos fenotipos están acompañados por una acumulación de varios intermediarios de pre-rRNA (Otsuka et al., 2021).

Ambos genes son expresados en tejidos meristemáticos, y su transcripción es inducida después de la incubación del medio, indicando que sus actividades están estrechamente relacionadas con capacidades altas de proliferación de las células. Estos procesos postranscripcionales no son los desencadenantes de la inducción de callos y es más probable que produzcan nuevos conjuntos de proteínas necesarias para el proceso de inducción. Sin embargo, análisis proteómicos previos presentaron alteraciones dinámicas en el perfil de la proteína nuclear de cotiledones de *Arabidopsis* sufriendo la inducción de callos (Ghosh y Xu, 2014; Xu et al., 2018).

4.10. Regeneración de células vegetales

Una característica especial de las células vegetales es su alta plasticidad para la diferenciación celular. La regeneración es una respuesta fisiológica conservada presente tanto en animales como plantas. Se refiere a la reparación de una pequeña amputación y a la formación de nuevos órganos o individuos, y cada modo de regeneración depende de cada especie (figura 15) (Birnbaum y Alvarado, 2008).



Figura 15. Regeneración de una planta a partir de un callo

Fuente: (Cheruvathur y Thomas, 2014)

A causa del descubrimiento del balance entre auxinas y citoquininas se determinaron niveles muy altos de auxina-citoquinina inducían la regeneración de raíces, mientras que altos de citoquinina-auxina promovían la inducción de brotes (Skoog y Miller, 1957). Por otra parte, con los descubrimientos y el uso de los reguladores de crecimiento, se realizaron investigaciones con células individuales de floema vascular de zanahoria y se demostró que las células retenían la totipotencialidad, destacando así el gran potencial regenerativo de las células somáticas vegetales (Steward et al., 1958).

La regeneración de las plantas puede clasificarse en tres principales categorías: regeneración de los tejidos, *de novo* organogénesis y embriogénesis somática.

4.10.1. Regeneración de tejidos

Cuando la planta es herida por alguna fuerza o acción, los tejidos son dañados, la planta activa varios mecanismos y comienza a regenerar de sus tejidos. En *Arabidopsis*, los estudios sobre regeneración se han enfocado en la regeneración de meristemas de raíz y el reparo celular de tejidos madre. En ambos estudios las auxinas juegan un papel importante en los procesos de regeneración con la regulación de los factores de transcripción (Xu y Huang, 2014). El nicho de las células madre de raíz está en la punta del meristema apical de la raíz (RAM), que comprende un centro inactivo (QC). El QC tiene de dos a cuatro células que se dividen lentamente y es controlado por el gen que codifica para un factor de transcripción WOX5 (Wuschel-Related Homeobox 5). Un estudio en maíz dio como resultado que cuando ocurre una escisión en la zona meristemática, rápidamente la raíz regenera un nuevo QC, originando una regeneración subsecuente de la punta de raíz, por lo tanto, la punta de raíz tiene potencial en reparación de tejidos (Aichinger et al., 2012).

Xu et al., (2006) menciona que cuando las células QC son sometidas a una inducción con láser, ocurren cambios dinámicos no solo en el transporte polar de auxinas, sino también los niveles de los factores de transcripción se ven afectados durante la regeneración del nuevo QC. Cuando los tejidos son dañados, la corriente de auxina se bloquea justo donde está la herida, resultando en una acumulación de las auxinas y relativamente con bajos niveles debajo del daño. Los altos niveles de auxina inducen la expresión del gen ANAC071 (factor de transcripción involucrado en la proliferación celular) de la familia de factores de

transcripción NAC (NAM, ATAF1,2 y CUC2), mientras que los niveles bajos de auxina inducen la expresión del gen RAP2.6L (factor de respuesta al etileno) de la familia de factores de transcripción APETALA2 (AP2) /ERF (Reid y Ross, 2011). Sin embargo, ambos genes son esenciales para la curación de las heridas en las plantas, se requiere una regulación para el gen RAP2.6L y dicha regulación ocurre con la presencia de ácido jasmónico, inducido por las heridas, y el etileno (Asahina et al., 2011).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Semillas de repollo

Se utilizó la variedad Royal Vantage, la cual produce grandes cabezas para el mercado fresco en México, además de su excelente vida de anaquel y su vigor lo que la hace adaptable a diferentes tipos de climas y condiciones de suelo, obteniéndose un alto rendimiento. Las semillas de repollo variedad Royal Vantage se obtuvieron en la casa comercial de Sakata, México.

5.2. Desinfección de semillas

Se probaron tres tratamientos con diferentes tiempos de desinfección con una solución de cloro y agua 1/3 (tabla 2). En cada tratamiento se manejó una solución de etanol al 70 %, una solución de cloro 1/3 (una parte de cloro y dos de agua) y agua destilada estéril.

Las semillas fueron desinfectadas en campana de flujo laminar con una solución de etanol al 70 % por 3 minutos en cada tratamiento. Después, fueron sumergidas a una solución de hipoclorito de sodio 1/3 (1 parte de cloro y 2 partes de agua destilada estéril) con 4 gotas de Tween 20 durante 15 minutos para el tratamiento 1, 25 minutos para el tratamiento 2 y 35 minutos para el tratamiento 3 (Tabla 3). Posteriormente, se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril y estuvieron en constante agitación con el fin de eliminar restos de detergente Tween 20. Finalmente, las semillas desinfectadas se colocaron en papel secante estéril por 40 minutos en cámara de flujo laminar.

Tabla 2. Tratamientos de desinfección de semillas

	Etanol 3%	Cloro 1/3	Agua destilada estéril
*TL1	3 minutos	15 minutos	5 minutos
TL2	3 minutos	25 minutos	10 minutos
TL3	3 minutos	35 minutos	15 minutos

*TL: tratamiento de lavado

5.3. Germinación

Para la germinación se sembraron 50 semillas de repollo (*B. oleracea* var. *Royal Vantage*), desinfectadas con el tratamiento de lavado 2, colocando 5 semillas por frasco que contenía 7 ml de medio de cultivo (agua, agar 0.8 %, medio MS basal y sucrosa 1 %) con pH ajustado a 5.70 – 5.80 con hidróxido de sodio (NaOH) 1M. Las semillas germinadas se contaron a los 5 días después de la siembra en el medio y se obtuvo el porcentaje de germinación y el porcentaje de contaminación presente.

5.4. Obtención de explantes

Los hipocótilos y cotiledones fueron cortados de las plántulas con un bisturí estéril 8 días después de la germinación. Todo el material vegetal obtenido fue cultivado en cajas Petri. Se colocaron 9 explantes de material vegetal por caja Petri. Los explantes fueron lesionados en la parte central con bisturí.

5.5. Inducción de callos

Para la inducción de callos, los explantes obtenidos se cultivaron en 7 tratamientos (tabla 3) con medio MS (Murashige y Skoog 1962), suplementados con diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (NAA) y ácido indolacético (IAA) y un control negativo. La inducción de callos se dejó en cámara bioclimática en total oscuridad, a 25 °C con 30 %RH, con cambios de medio cada 10 días.

Tabla 3. Concentraciones de reguladores de crecimiento por tratamiento.

TRATAMIENTOS	REGULADORES DE CRECIMIENTO		
	BAP	NAA	IAA
T1	-	2 mgL ⁻¹	-
T2	5 mgL ⁻¹	2 mgL ⁻¹	-
T3	2 mgL ⁻¹	2 mgL ⁻¹	-
T4	5 mgL ⁻¹	2 mgL ⁻¹	5 mgL ⁻¹
T5	2 mgL ⁻¹	2 mgL ⁻¹	5 mgL ⁻¹
T6	-	-	5 mgL ⁻¹
Control Negativo	-	-	-

5.6. Cuantificación de callos

Los callos obtenidos en cada tratamiento fueron cuantificados 28 días después, para evaluar la efectividad de los diferentes medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. También se evaluó los días que tardaron los explantes en inducir callos, el número de callos presentes por explante y el número de explantes que formaron callo. Los explantes que no presentaban desarrollo de callos, fueron cultivados 10 días más. Con los datos obtenidos de la cuantificación de presencia de callos a los 28 días, fueron comparados mediante un análisis de varianza de dos factores (factor 1: tipo de explante y factor 2: es el tratamiento con promotores del crecimiento), así mismo se determinó la interacción entre las dos vías, y se realizaron graficas comparativas de las medias de los resultados utilizando el software R-studio (Proc Plot Mean).

5.7. Regeneración de la planta

De los callos obtenidos se realizó un subcultivo en medio MS de todos los tratamientos donde los explantes lograron formar mínimo un callo, suplementado con la mezcla de los tres reguladores de crecimiento durante 15 días bajo condiciones controladas de clima en cámara bioclimática. Se contabilizaron los brotes presentes en cada tratamiento a los 10 días después del tercer cambio de medio.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Desinfección de semillas

Al sembrar las semillas de cada tratamiento, se observó que el tratamiento 2 disminuía la contaminación de las semillas y no inhibía la germinación de las mismas (figura 16).

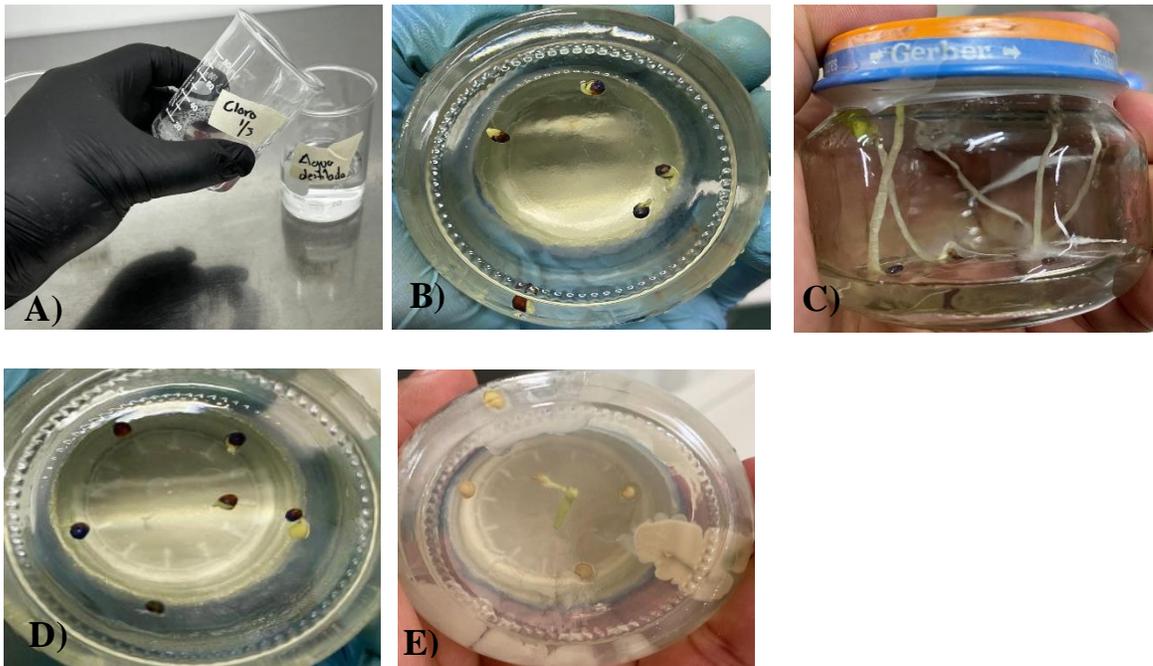


Figura 16. Desinfección de semillas de repollo. A) Lavado con cloro 1/3, B) Semillas emergiendo sin presencia de contaminantes, C) Plántulas germinadas, D) Semillas con germinación inhibida, E) Contaminante presente en el medio.

Mientras tanto el tratamiento 1 no evitaba por completo la contaminación presente. El medio de cultivo donde se sembraron estas semillas presentó indicios de contaminación tres días después de la siembra. Las semillas tratadas con el tratamiento 3 no germinaron adecuadamente, posiblemente debido a que permanecieron demasiado tiempo sumergidas y la capa que cubre al embrión se desprendió dejando al embrión descubierto con el cloro, por lo tanto, las semillas no germinaron (tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de germinación y de contaminación en el proceso de lavado.

	% de contaminación	% de germinación
TL1	80	50
TL2	10	95
TL3	0	35

Jevšnik y Luthar, (2015) reportaron una eficiencia de desinfección del 100 % de 4 tratamientos con semillas de diferentes plantas. El lavado de las semillas en centrifuga y sumergidas en soluciones de 16.6 g/l de Na₂ disuelto en agua con detergente Tween 20 y realizando solamente 3 enjuagues para eliminar residuos del agente desinfectante fue muy eficiente, por lo tanto, se logró eliminar el posible agente contaminante en un 100 % en los 4 tratamientos, y obteniendo un 70 % de germinación 7 días después de la siembra en el medio de cultivo. Sin embargo, otros autores reportan el uso de otras sustancias u otros instrumentos como la filtración, desinfección por gas, gases basados en cloro, soluciones como hipoclorito, Na₂, sal o ácido dicloroisocianúrico, desinfectante Virkun S, peróxido de hidrógeno, entre otros (Hicks y Huber, 2000). Cabe mencionar que Hicks y Huber, (2000) describen un método aún más eficiente llamado “presoak” que consiste en sumergir las semillas en agua y posteriormente en una solución a base de azúcar, haciendo vulnerable a hongos, pero también ayuda a humedecer la semilla que es un paso importante en el proceso de germinación de estas.

Por otra parte, dos Santos et al., (2020) describen un protocolo de desinfección usando una solución de alcohol al 70 % y luego se pasan a una solución comercial (Candura) de hipoclorito de sodio (NaOCl) con 2 - 2.5% de cloro activo y con enjuagues con agua destilada estéril para eliminar el agente desinfectante. Dicho protocolo presentó un porcentaje de contaminación del 29.25% bacteriana, un porcentaje muy bajo a diferencia del utilizado en este estudio que la mayoría de los contaminantes fueron fúngicos y muy poco porcentaje fue bacteriano.

Santos et al., (2019) reporta que el empleo de bajas concentraciones (1%) y el tiempo que permanecen las semillas en la solución desinfectante es eficiente para el establecimiento *in vitro* de las semillas, ya que no se presenta toxicidad ni inhibición de las semillas. Mientras más tiempo se encuentran expuestas las semillas al agente desinfectante más lo absorbe la

semilla, reaccionando con sus aminoácidos y generando altas concentraciones de cloruro de amonio (NH_4Cl) y dióxido de carbono (CO_2). De los 7 tratamientos que se utilizaron, solo el 3, 4 y 7 presentaron los % de contaminación $< 30\% > 10\%$ más altos debido a la ausencia de hipoclorito. Sin embargo, obtuvieron un % de germinación mayor al 70 % pero menor al 90 %. Mientras que los demás tratamientos presentaron niveles de contaminación bajo con un porcentaje de germinación similar entre ellos mayor al 85 %. Por otra parte, este estudio no hubo ausencia de la solución de hipoclorito, y en un tratamiento hubo nula presencia de contaminación.

6.2. Inducción de callos

Los explantes que alcanzaron un mayor desarrollo de callos fueron los hipocótilos respecto a los cotiledones. De los tres reguladores de crecimiento, el IAA fue el regulador que más estimuló la inducción de los callos. Los tratamientos con mayor concentración de IAA desarrollaron raíz principal. En cotiledones, indujo el desarrollo de pelos radiculares. La mayoría de los tratamientos indujeron callos, debido a la combinación de diferentes reguladores de crecimiento teniendo como resultado $> 60\%$ en cotiledones y $> 85\%$ en hipocótilos. Cada tratamiento se evaluó la potencia en la cual los reguladores de crecimiento indujeron callos, el número de explantes que lograron formar callo, el número de callos presentes por explante y el tiempo el cual los explantes lograron inducir callo exitosamente (tabla 5).

En los primeros 7 días algunos explantes comenzaron a cambiar de tamaño y solo pocos iniciaron con la inducción de callos, mientras el resto inducía la desdiferenciación de las células vegetales para formar el callo (figura 17).

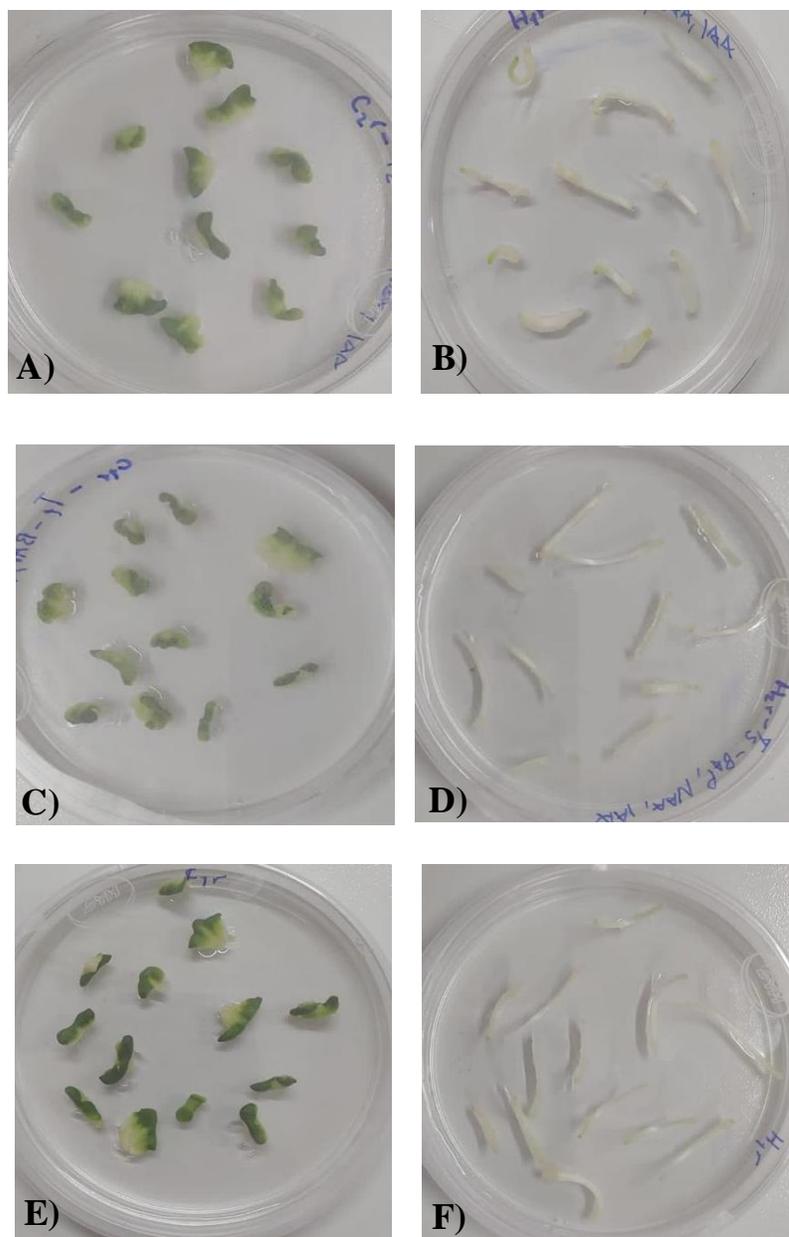


Figura 17. Explantes establecidos en medio de cultivo MS. A) Tratamiento 1 - cotiledones, B) Tratamiento 1 - Hipocótilos, C) Tratamiento 2 - cotiledones, D) Tratamiento 2 - hipocótilos, E) Tratamiento 3 - cotiledones, F) Tratamiento 3 - hipocótilos.

Los tratamientos 1, 2 y 3 comenzaron a formar pocos callos con presencia de pelos radiculares en la zona que se encuentra en contacto con el medio de cultivo. La parte que no se encuentra en contacto con el medio comenzó a aumentar su tamaño. El tratamiento que formó callo los primeros 7 días fue el tratamiento 4, el cual ya presentaba al menos dos callos inducidos por explantes de hipocótilos (figura 18).



Figura 18. Desarrollo de callos del tratamiento 4 en hipocótilos.

En cotiledones la zona donde se indujo callo comenzó a desarrollar pelos radiculares los cuales cubrían totalmente el callo.

Los tratamientos 6 y 7 comenzaron a desarrollar raíz principal acompañada con pelos radiculares, sin inducción de callo (figura 20). Además, los explantes de cotiledones incrementaron de tamaño, a diferencia de los explantes de hipocótilos que solo pasaron de tamaño pequeño a tamaño mediano.

A partir del día 12, se observó inducción de callo en todos los tratamientos, a excepción del tratamiento control, también el desarrollo de pelos radiculares en explantes donde no se observó desarrollo días anteriores. Asimismo, se presentaron explantes muertos con incidencia de callo. Por otra parte, los tratamientos 5 y 7 no desarrollaron pelos radiculares, solo los explantes tuvieron una mayor tasa de crecimiento. Los explantes de hipocótilos del tratamiento 5 no incrementaron de tamaño, a diferencia de otros tratamientos donde el material vegetal creció unos pocos milímetros. Mientras tanto, los tratamientos 4, 5 y 6 presentaron los niveles más altos de callos inducidos después de 12 días, donde el ácido-3-indol acético (IAA) estuvo mezclado con el medio de cultivo. Sin embargo, en los demás tratamientos se observó que la inducción de callos solo se presentaba en un porcentaje más bajo en los tratamientos restantes. Mientras tanto, en ambos explantes del control negativo solo hubo presencia de raíz principal de gran tamaño, al igual que los explantes. La presencia de gran porcentaje de callos en los explantes de cada tratamiento comenzó el día 21 (tabla 5). Se observó que los explantes de hipocótilos del tratamiento 4 comenzaron a diferenciarse

en una parte del callo (figura 19), asimismo los pelos radiculares presentes en este tratamiento disminuyeron debido al comienzo de la diferenciación de las células.



Figura 19. Callos del tratamiento 4 con pelos radiculares y comienzo de diferenciación de las células.

Sin embargo, los cotiledones del tratamiento 2 obtuvieron el porcentaje más bajo en el desarrollo de callos y los cotiledones del tratamiento 5 generó pelos radiculares alrededor del callo, mientras que la otra parte del explante que solo está en contacto con el medio de cultivo aumentó de tamaño. Cabe mencionar que solo el tratamiento 6 desarrolló por completo una raíz principal en presencia de pelos radiculares en el lugar donde se indujo callo. Los hipocótilos del tratamiento 6 también desarrollaron raíz con pelos radiculares, pero de un tamaño más pequeño. También en los explantes se observó que una parte del cotiledón no desdiferenciado comenzó a necrosarse.

Al final, un gran número de explantes, tanto de cotiledones como hipocótilos, desarrollaron callos en todos los tratamientos, se observó que la mayoría de los explantes formaron callo en la mayoría del cotiledón, mientras que en algunos tratamientos de hipocótilos el callo se formó en los extremos, o en todo el explante (tabla 5).

En el tratamiento 2 se observó poca inducción de callo y los explantes se quedaron con un tamaño pequeño, a comparación de los demás explantes de los diferentes tratamientos. En el caso del tratamiento control, los explantes de cotiledones e hipocótilos desarrollaron una raíz principal, sin callo (figura 20).

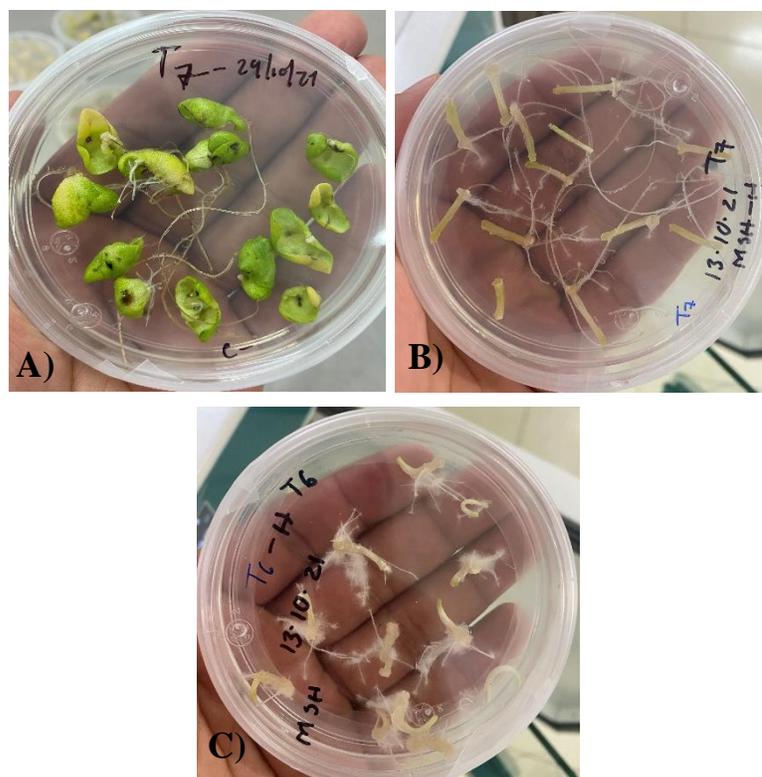


Figura 32. Tratamiento 6 y 7 con presencia de raíz principal. A) Cotiledones – tratamiento 7, B) Hipocótilos – tratamiento 7, C) Hipocótilos – tratamiento 6

Khalafalla et al., (2010) reportan el empleo de diferentes concentraciones de la auxina 2,4-D (ácido 2, 4 – diclorofenoxi acético) añadido en la formulación del medio de cultivo. Además de que los explantes cultivados sobre medio sin esta fitohormona fallaron en la inducción de callo, concluyendo que la auxina 2,4-D tiene la capacidad de iniciar el proceso de callogénesis. La auxina en combinación con alguna citoquinina es muy común en la formación de callos y también para mantenerlos (Castillo et al., 1998). Sin embargo, diversas investigaciones concluyeron que la 2,4-D es la mejor auxina para la inducción de callos tanto en plantas monocotiledóneas, así como también en plantas dicotiledóneas. En este estudio se reportó un % de éxito del 100 % en cuatro tratamientos con concentraciones $> 2.0 \text{ mgL}^{-1}$, para esta investigación solo dos tratamientos tuvieron un 100 % de éxito con una concentración de auxinas de 5 y 2 mgL^{-1} en conjunto con una citoquinina con una concentración de 5 mgL^{-1} .

Por otra parte, Ahmad et al., (2010) reportan una frecuencia de inducción de callos en aproximadamente 45 – 70 % de los explantes, dependiendo del tipo de auxina y la

concentración de esta. Con una concentración de 2.5 μM de la auxina NAA solo el 45 % de los explantes lograron inducir callo, sin embargo, con un aumento en la concentración (10 μM) el porcentaje de explantes con callo también aumentó de 45 % a 68.3 %. En un tratamiento con la auxina sintética 2,4,5-T (2,4,5-triclorofenoxiacético) con una concentración de 10 μM el mismo porcentaje de explantes logra formar callo. También mencionan que un aumento de la concentración sugerida puede llegar a disminuir el % de explantes que forman callo. En este estudio con la mezcla de tres reguladores de crecimiento y su interacción (auxina-citoquinina) el 90 % de los explantes de hipocótilos pudo inducir el proceso de formación de callos, con concentraciones variables que oscilan entre los 2 mgL^{-1} hasta los 5 mgL^{-1} sin exceder esta cantidad, mientras que los explantes de cotiledones bastó con una concentración de 3 mgL^{-1} para inducir callo, incluso para el desarrollo de pelos radiculares alrededor del explante.

Bakhtiar et al., (2016) describió un protocolo empleando 4 reguladores de crecimiento, 2,4-D, NAA, BAP y KN (quinetina) ya sea añadidas solas al medio o combinadas una con otra. Los callos comenzaron a observarse 25 – 30 días después del cultivo que a diferencia con este estudio que en los primeros 10 días se observaron los primeros indicios de callo en explantes de hipocótilos y cotiledones. Los explantes utilizados dieron resultados con un alto % de callos formados, lo que confirma la interacción de uno o más reguladores de crecimiento induce callogénesis en varias plantas, como, por ejemplo, *Mentha spicata*, *Thymus hyemalis* y *Brassica oleracea* (Nordine et al., 2014; Poovaiah et al., 2006).

En este estudio el tratamiento control no indujo callo, solamente se desarrolló una raíz principal y en la investigación realizada por Bakhtiar *et al.*, el tratamiento control no presentó desarrolló ni de callos ni de raíz u otro órgano. Con una concentración de 1.0 y 2.0 mgL^{-1} los explantes formaron callos color café, pero si se aumenta la concentración hasta aproximadamente 3.0 mgL^{-1} y se induce callo en explantes el color de los callos cambia a un tono café oscuro. En este estudio realizado, el tono de los primeros callos fue de color amarillo. Los explantes cultivados en un medio suplementado con NAA solamente se forman callos con color café claro.

Tabla 5. Resultados por tratamiento y tipo de explante.

Tratamiento	Tipo de explante	% de explantes con callos	Tiempo en días	# de callos	% de regeneración
T1	Hipocótilo	44	17	2	0
	Cotiledón	76	20	1	0
T2	Hipocótilo	36	21	1	0
	Cotiledón	36	12	2	0
T3	Hipocótilo	72	14	1	0
	Cotiledón	80	19	3	0
T4	Hipocótilo	100	6	2	10
	Cotiledón	64	8	3	0.5
T5	Hipocótilo	100	10	2	0
	Cotiledón	76	12	1	0
T6	Hipocótilo	92	9	2	0
	Cotiledón	68	10	1	0

6.3. Análisis de varianza

El análisis de la varianza de dos vías arrojó diferencias altamente significativas en cuanto a los tratamientos, lo cual significa al menos en un tratamiento el promedio de los callos fue estadísticamente diferente al promedio de todos los demás tratamientos (tabla 6), siendo el tratamiento 5 el que alcanzo un mayor promedio de presencia de callos por explante, y el tratamiento 2 el menor promedio (figura 21). Por otra parte, la naturaleza del explante no mostró diferencias significativas, lo cual implica que el explante es indistinto al tratar de inducir formación de callos con los tratamientos utilizados (tabla 6), aun cuando el promedio de explantes con callos es ligeramente mayor en los hipocótilos (figura 22). Sin embargo, si hay una interacción significativa entre el tipo de explantes y los tratamientos utilizados, por lo cual, aun cuando el explante utilizado es indistinto, si es relevante cuando se utiliza en conjunto con algún tratamiento en específico.

Bakhtiar et al., (2016) reporta un 96 % de proliferación de callos con un promedio de 6.8 ± 1.0 (promedio \pm error estándar) con una interpretación significativa en los tratamientos, mientras que un 78 % de proliferación con un promedio 3.4 ± 0.5 la cual se interpreta de manera no significativa diferente a $P < 0.05$ en ambos casos. Por otra parte, Ahmad et al., (2010) reporta un mayor número de valores con interpretación significativa de 20 réplicas

por tratamiento en tres experimentos repetidos. El tratamiento con mayor respuesta a la inducción de callo fue de 92 % con un promedio de 92.4 ± 1.12 , con una concentración de $7.5 \mu\text{M}$ de BAP y $1.0 \mu\text{M}$ de NAA. Otros tratamientos se interpretan de manera no significativa como lo es el tratamiento con concentración de $7.5 \mu\text{M}$ de BAP y $2.5 \mu\text{M}$ de IBA.

Tabla 6. Análisis de la varianza para los promedios de callos por tratamiento, tipo de explante e interacción ($p < 0.05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Valor P	Interpretación
Tratamientos	6	24557.1079	7.6E-06	Altamente significativo
Explantos	1	263.59029	0.29967	No Significativo
Interacción	6	3257.18119	0.08417	Significativo
Modelo	13	28077.8794		
Error	14	3181.15425		

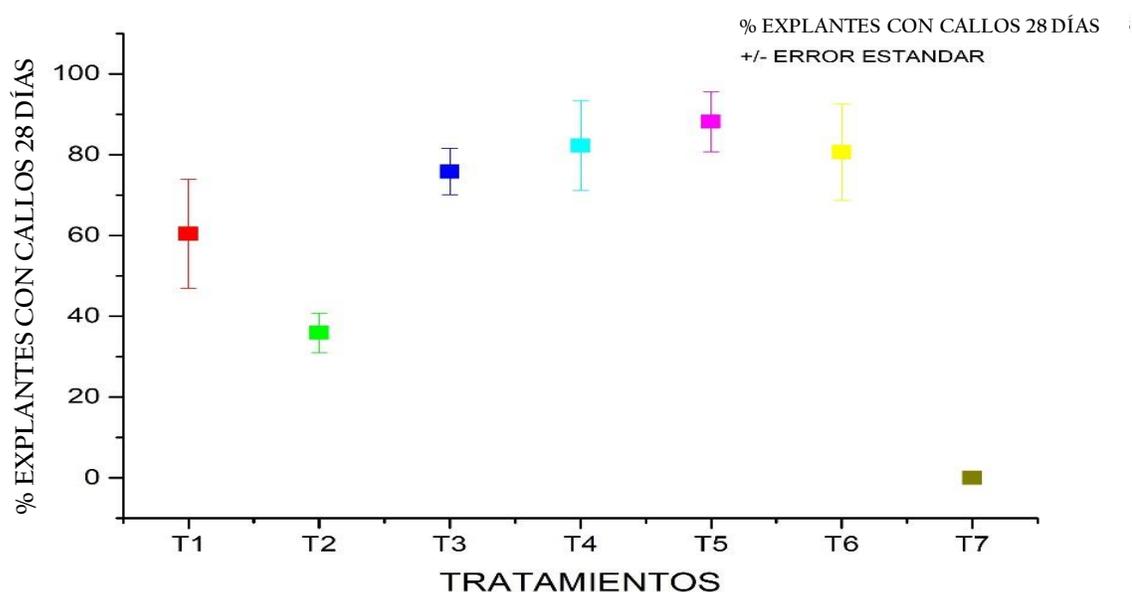


Figura 40. Comparación de medias (+/- error estándar) de los porcentajes de explantes con callos por tratamiento.

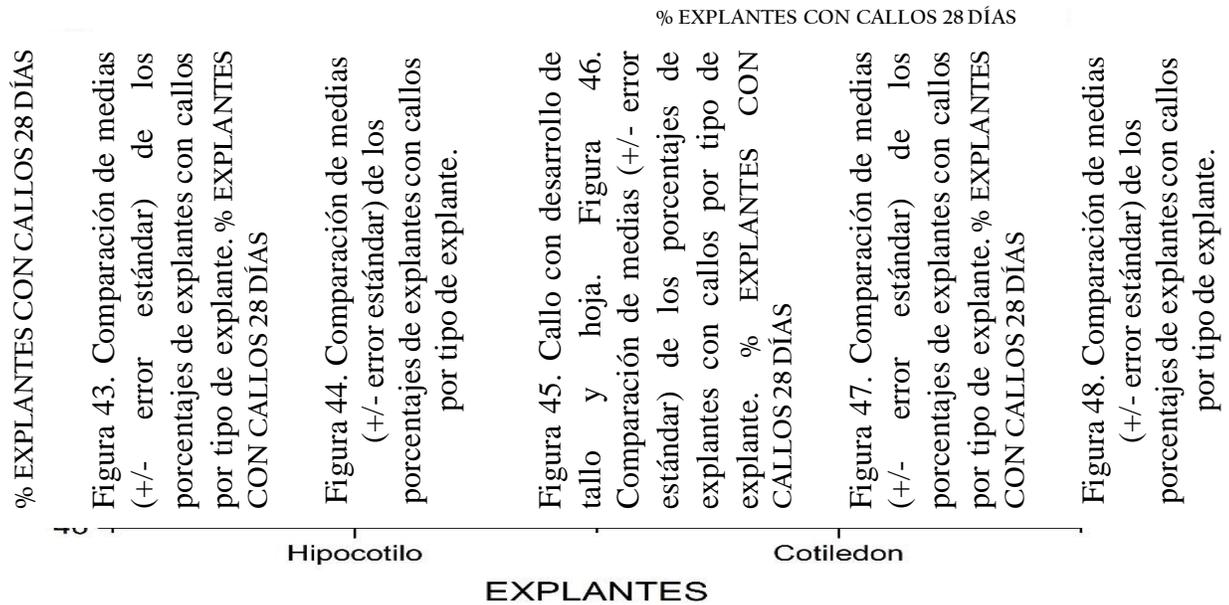


Figura 42. Comparación de medias (+/- error estándar) de los porcentajes de explantes con callos por tipo de explante.

6.4. Diferenciación de callos

Los explantes que presentaron potencial de regeneración fueron los del tratamiento 4, donde después de 3 cambios de medio a un medio fresco cada 8 días y varios cortes del callo para hacer subcultivos se presentó el desarrollo de pequeñas hojas y un tallo (figura 23).



Figura 62. Callo con desarrollo de tallo y hoja.

Cabe mencionar que no todos los tratamientos presentaron potencial de regeneración, debido a la ausencia de un regulador o la mezcla de otros que no tienen la capacidad de poder regenerar una planta a partir de un callo (tabla 6).

La mezcla del BAP, NAA y IAA presentó un bajo porcentaje de regeneración, pero fue el único tratamiento que tuvo esta capacidad (figura 24)



Figura 63. Callo diferenciado del tratamiento 4 (BAP, NAA y IAA).

Kanwar et al., (2010) reporta un porcentaje de regeneración de 54.67 % cuando los explantes se encuentran en un medio suplementado con una mezcla de tres reguladores de crecimiento (citoquinina-auxina-giberelina) con concentraciones de 8 μM de BA (6-benciladenina), 6 μM de NAA y 6 μM de GA_3 . En algunos tratamientos se indujo la regeneración de brotes y aparecieron alrededor de 8 brotes por callo con un tamaño de 1.93 cm. En el caso de este estudio solo apareció un brote en un solo callo obtenido de explante de hipocótilo con BAP en lugar de BA y IAA en lugar de GA_3 en el medio de cultivo. En cuanto al tamaño del brote se estima de 1.0 a 1.40 cm. Sin embargo, en los reportes de Kanwar *et al.*, (2010) solo los cotiledones respondieron de manera positiva a la regeneración y los callos de hipocótilos no regeneraron y los callos presentaron un color café con el paso del tiempo. Shekhawat et al., (2015) suplementaron un medio con una concentración de 2.0 mgL^{-1} de BAP y otro con una combinación de KN, así como un tratamiento control el cual no presentó indicios de regeneración de los explantes. Se observó que el tratamiento con BAP solamente es más efectivo comparado con resultados obtenidos del tratamiento con KN. A diferencia de este estudio, el BAP presentó bajo porcentaje de regeneración en callos, solo comenzó el proceso de regeneración cuando se encuentra en presencia de otro regulador.

7. CONCLUSIÓN

El establecimiento de un protocolo para inducir y diferenciar callos depende del tipo de regulador de crecimiento, la concentración a usar, el tipo de planta, entre otros factores para que sea exitoso. La asepsia de semillas juega un papel importante en el cultivo *in vitro*, se estableció que el mejor tratamiento de lavado para este proceso fue el 2 (tres minutos en etanol al 70%, 25 minutos en cloro en relación uno a tres y diez minutos de enjuague con agua destilada estéril), debido al menor porcentaje de contaminación y a la mayor efectividad de germinación que se presentó bajo este régimen. La naturaleza del explante no mostró diferencias significativas, por lo que es indistinto al tratar de inducir formación de callos con los tratamientos utilizados, sin embargo, se observó mayor eficacia en los hipocótilos, estos presentaron una tasa mayor de inducción de callos y de regeneración de estos, aunado a un tiempo menor de crecimiento. Asimismo, la mezcla de diferentes reguladores de crecimiento ya sea de dos o más, tiene alta potencia de proliferación de un callo, además del alto potencial de regeneración que se presenta con altas concentraciones de auxinas y concentraciones bajas de citoquininas. La concentración de 5 mgL⁻¹ BAP, 2 mgL⁻¹ NAA y 5 mgL⁻¹ IAA arrojó una mayor tasa de efectividad en la inducción y diferenciación de callos.

8. LITERATURA CITADA

- Agnola, B., Boury, S., Monot, C., Quillévéré, A., Hervé, Y., & Silué, D. (2003). Evidence that a leaf-disk test allows assessment of isolate-specific resistance in *Brassica oleracea* crops against downy mildew (*Peronospora parasitica*). *European Journal of Plant Pathology*, *109*(5), 471–478.
- Ahmad, N., Faisal, M., Anis, M., & Aref, I. M. (2010). In vitro callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Ruta graveolens* L. *South African Journal of Botany*, *76*(3), 597–600. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.03.008>
- Aichinger, E., Kornet, N., Friedrich, T., & Laux, T. (2012). Plant stem cell niches. *Annual Review of Plant Biology*, *63*, 615–636.
- Armstrong, D. J. (2019). Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In *Cytokinins* (pp. 139–154). CRC Press.
- Asahina, M., Azuma, K., Pitaksaringkarn, W., Yamazaki, T., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Okada, K., & Nishimura, T. (2011). Spatially selective hormonal control of RAP2. 6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(38), 16128–16132.
- Babula, D., Kaczmarek, M., Ziółkowski, P. A., & Sadowski, J. (2007). *Brassica oleracea*. In *Vegetables* (pp. 227–285). Springer.
- Bakhtiar, Z., Mirjalili, M. H., & Sonboli, A. (2016). In vitro callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* (Lamiaceae), an endangered medicinal plant. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, *16*(1), 48–54. <https://doi.org/10.1590/1984-70332016v16n1a8>
- Bakshi, A., Shemansky, J. M., Chang, C., & Binder, B. M. (2015). History of research on the plant hormone ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*, *34*(4), 809–827.
- Bartholomew, D. P. (2013). History and perspectives on the role of ethylene in pineapple flowering. *XII International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production 1042*, 269–284.
- Basuchaudhuri, P. (2016). 1-Naphthaleneacetic acid in rice cultivation. *Current Science*, *52*–56.

- Baulcombe, D. C., & Key, J. L. (1980). Polyadenylated RNA sequences which are reduced in concentration following auxin treatment of soybean hypocotyls. *Journal of Biological Chemistry*, *255*(18), 8907–8913.
- Baute, J., Herman, D., Coppens, F., de Block, J., Slabbinck, B., Dell'Acqua, M., Pè, M. E., Maere, S., Nelissen, H., & Inzé, D. (2016). Combined large-scale phenotyping and transcriptomics in maize reveals a robust growth regulatory network. *Plant Physiology*, *170*(3), 1848–1867.
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). General Requirements and Techniques. In *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* (pp. 11–25). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_2
- Birnbaum, K. D., & Alvarado, A. S. (2008). Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals. *Cell*, *132*(4), 697–710.
- Calderon-Villalobos, L. I., Tan, X., Zheng, N., & Estelle, M. (2010). Auxin perception—structural insights. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(7), a005546.
- Campanoni, P., & Nick, P. (2005). Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiology*, *137*(3), 939–948.
- Cardoza, V., & Stewart, C. N. (2004). Brassica biotechnology: progress in cellular and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *40*(6), 542–551.
- Carimi, F., Zottini, M., Formentin, E., Terzi, M., & lo Schiavo, F. (2003). Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta*, *216*(3), 413–421.
- Carman, J. G., Jefferson, N. E., & Campbell, W. F. (1988). Induction of embryogenic *Triticum aestivum* L. calli. I. Quantification of genotype and culture medium effects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *12*(1), 83–95.
- Castillo, A. M., Egana, B., Sanz, J. M., & Cistue, L. (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. *Plant Cell Reports*, *17*(11), 902–906.
- Chapman, E. J., & Estelle, M. (2009a). Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annual Review of Genetics*, *43*, 265–285.
- Chapman, E. J., & Estelle, M. (2009b). Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annual Review of Genetics*, *43*(1), 265–285.

- Chen, C.-M., Ertl, J. R., Leisner, S. M., & Chang, C.-C. (1985). Localization of cytokinin biosynthetic sites in pea plants and carrot roots. *Plant Physiology*, *78*(3), 510–513.
- Chen, L.-P., Zhang, M.-F., Xiao, Q.-B., Wu, J.-G., & Hirata, Y. (2004). Plant regeneration from hypocotyl protoplasts of red cabbage (*Brassica oleracea*) by using nurse cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *77*(2), 133–138.
- Cheruvathur, M. K., & Thomas, T. D. (2014). Shoot organogenesis from root-derived callus of *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz. and assessment of clonal fidelity of micropropagated plants using RAPD analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *172*(3), 1172–1182. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0598-z>
- Cucinotta, M., Colombo, L., & Roig-Villanova, I. (2014). Ovule development, a new model for lateral organ formation. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 117.
- da Silva, J. A. T. (2012). Is BA (6-benzyladenine) BAP (6-benzylaminopurine)? *Asian Aust J Plant Sci Biotechnol*, *6*(Special Issue 1), 121–124.
- Daud, N. F. A., Hasbullah, N. A., Azis, N. A., Rasad, F. M., Amin, M. A. M., & Lassim, M. M. (2015). In vitro regeneration of *Brassica oleracea* var. capitata through stems, roots, leaves and petioles cultures. *International Conference on Agricultural, Ecological and Medical Sciences (AEMS-2015) April*, 7–8.
- de Fossard, R. A. (1976). *Tissue culture for plant propagators*. Dept. of Botany, University of New England.
- de SOUZA, C. M. (1998). Effect of thidiazuron on multiplication of cabbage" in vitro". *Cincia-e-Agrotechnologia*, *22*(1), 52–56.
- Debergh, P. C., & Read, P. E. (1991). Micropropagation. In *Micropropagation* (pp. 1–13). Springer.
- den Boer, B. G. W., & Murray, J. A. H. (2000). Triggering the cell cycle in plants. *Trends in Cell Biology*, *10*(6), 245–250.
- Dharmasiri, N., & Estelle, M. (2004). Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends in Plant Science*, *9*(6), 302–308.
- dos Santos, M. M., Cezario, L. F. C., Simões, I. M., Baptista, J. O., Araujo, C. P. de, de Mello, T., Mayard, H., Gonçalves, E. de O., Fontes, M. M. P., Schimdt, E. R., Lopes, J. C., Caldeira, M. V. W., & Alexandre, R. S. (2020). Disinfection protocol and in vitro

- germination of seeds of *dalbergia nigra*. *Cerne*, 26(2), 238–246.
<https://doi.org/10.1590/01047760202026022714>
- Erie, L. J., French, O. F., Bucks, D. A., & Harris, K. (1982). Consumptive use of water by major crops in the southwestern United States. *Conservation Research Report*, 29.
- Everardo Zamora, P. (n.d.). *EL CULTIVO DEL REPOLLO*.
- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science*, 10, 536.
- Frébort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frébortová, J., & Galuszka, P. (2011). Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2431–2452.
- Friml, J. (2003). Auxin transport—shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(1), 7–12.
- Fuentes, F. E., & Perez, J. (2003). *Guia tecnica: cultivo del repollo*. Centro Nacional de Tecnologia Agropecuaria y Forestal, San Salvador (El
- Galston, A. W., & Dalberg, L. Y. (1954). The adaptive formation and physiological significance of indoleacetic acid oxidase. *American Journal of Botany*, 373–380.
- Gambhir, G., Kumar, P., & Srivastava, D. K. (2017). High frequency regeneration of plants from cotyledon and hypocotyl cultures in *Brassica oleracea* cv. Pride of India. *Biotechnology Reports*, 15, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.02.005>
- Gautheret, R. J. (1939). Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *CR Hebd. Seances Acad. Sc*, 208, 118–120.
- George, E. F., Hall, M. A., & de Klerk, G.-J. (2008). Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In *Plant propagation by tissue culture* (pp. 205–226). Springer.
- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G.-J. de. (2008a). Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. In *Plant propagation by tissue culture* (pp. 227–281). Springer.
- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G.-J. de. (2008b). The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In *Plant propagation by tissue culture* (pp. 115–173). Springer.

- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., & Kowalczyk, T. (2015). In vitro regeneration of eight cultivars of *Brassica oleracea* var. *capitata*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *51*(1), 80–87.
- Ghosh, D., & Xu, J. (2014). Abiotic stress responses in plant roots: a proteomics perspective. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 6.
- Grzegorzczak-Karolak, I., Kuźma, Ł., & Wysokińska, H. (2015). The effect of cytokinins on shoot proliferation, secondary metabolite production and antioxidant potential in shoot cultures of *Scutellaria alpina*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *122*(3), 699–708.
- Guilfoyle, T. J., & Hagen, G. (2007). Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology*, *10*(5), 453–460.
- Hammerschlag, F. A., Owens, L. D., & Smigocki, A. C. (1988). Peach improvement through the use of tissue culture and gene-transfer techniques. *II International Peach Symposium 254*, 17–24.
- Han, X., Hyun, T. K., Zhang, M., Kumar, R., Koh, E., Kang, B.-H., Lucas, W. J., & Kim, J.-Y. (2014). Auxin-callose-mediated plasmodesmal gating is essential for tropic auxin gradient formation and signaling. *Developmental Cell*, *28*(2), 132–146.
- Hardtke, C. S., Ckurshumova, W., Vidaurre, D. P., Singh, S. A., Stamatiou, G., Tiwari, S. B., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., & Berleth, T. (2004). *Overlapping and non-redundant functions of the Arabidopsis auxin response factors MONOPTEROS and NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4*.
- Haynes, C., Everhart, E., Jauron, R., Nelson, D., & Lenahan, J. (2009). *Cole Crops. Iowa State University Extension*.
- Hentsch, B., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Lints, T. J., Adams, J. M., & Harvey, R. P. (1996). Hlx homeo box gene is essential for an inductive tissue interaction that drives expansion of embryonic liver and gut. *Genes & Development*, *10*(1), 70–79.
- Hicks, A. J., & Huber, R. (2000). *Asymbiotic technique of orchid seed germination* (Issue 635.93415 H631a). Chandler, US: Orchid Seedbank Project.
- Higuchi, M., Pischke, M. S., Mähönen, A. P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Kato, T., & Tabata, S. (2004). In planta functions of the

- Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(23), 8821–8826.
- Hwang, I., & Sheen, J. (2001). Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature*, 413(6854), 383–389.
- Ikeuchi, M., Iwase, A., Rymen, B., Lambolez, A., Kojima, M., Takebayashi, Y., Heyman, J., Watanabe, S., Seo, M., & de Veylder, L. (2017). Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes. *Plant Physiology*, 175(3), 1158–1174.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: Mechanisms of induction and repression. In *Plant Cell* (Vol. 25, Issue 9, pp. 3159–3173). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>
- I.M., A., & M., A. (2012). Plant Tissue Culture Media. In *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. InTech. <https://doi.org/10.5772/50569>
- Jain, N., & Babbar, S. B. (2002). Gum katira—a cheap gelling agent for plant tissue culture media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71(3), 223–229.
- Jameson, P. E. (2000). Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions—An overview. *Plant Growth Regulation*, 32(2), 369–380.
- Jevšnik, T., & Luthar, Z. (2015). Successful disinfection protocol for orchid seeds and influence of gelling agent on germination and growth. *Acta Agriculturae Slovenica*, 105(1), 95–102. <https://doi.org/10.14720/aas.2015.105.1.10>
- Kacar, Y. A., Biçen, B., Varol, I., Mendi, Y. Y., Serçe, S., & Çetiner, S. (2010). Gelling agents and culture vessels affect in vitro multiplication of banana plantlets. *Genetics and Molecular Research*, 9(1), 416–424.
- Kamada, H., & Harada, H. (1979). Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures II. Effects of amino acids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 91(5), 453–463.
- Kanwar, K., Joseph, J., & Deepika, R. (2010). Comparison of in vitro regeneration pathways in *Punica granatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100(2), 199–207. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9637-4>
- Khalafalla, M., Sulieman Modawi, R., Khalafalla, M. M., Abd Elaleem, K. G., & Modawi, R. S. (2010). CALLUS FORMATION AND ORGANOGENESIS OF POTATO

- (SOLANUM TUBEROSUM L.) CULTIVAR ALMERA Production of DNA polymerase from thermophilic bacteria isolated from Akash hot springs View project Plant tissue culture View project CALLUS FORMATION AND ORGANOGENESIS OF POTATO (SOLANUM TUBEROSUM L.) CULTIVAR ALMERA. *Journal of Phytology*, 2010(5), 40–46. <https://www.researchgate.net/publication/285598495>
- Khan, N., Bano, A. M. D., & Babar, A. (2020). Impacts of plant growth promoters and plant growth regulators on rainfed agriculture. *PloS One*, 15(4), e0231426.
- Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development*, 145(4), dev149344.
- Kiełkowska, A., & Adamus, A. (2012). An alginate-layer technique for culture of Brassica oleracea L. protoplasts. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(2), 265–273.
- Kim, H. B., Lee, H., Oh, C. J., Lee, N. H., & An, C. S. (2007). Expression of EuNOD-ARPI encoding auxin-repressed protein homolog is upregulated by auxin and localized to the fixation zone in root nodules of *Elaeagnus umbellata*. *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*, 23(1).
- Kotte, W. (1922). Kulturversuche mit isolierten Wurzelspitzen. *Beitr. Allg. Bot.*, 2, 413–434.
- Krzyżanowska, D., Górecka, K., Kiszczak, W., & Kowalska, U. (2006). The effect of genotype and medium on plant regeneration from androgenic embryos. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 14(1), 121–127.
- Kumar, P. P., & Loh, C. S. (2012). Plant tissue culture for biotechnology. In *Plant biotechnology and agriculture* (pp. 131–138). Elsevier.
- Libbenga, K. R., & Mennes, A. M. (1995). Hormone binding and signal transduction. In *Plant hormones* (pp. 272–297). Springer.
- Lipavská, H., Mašková, P., & Vojvodová, P. (2011). Regulatory dephosphorylation of CDK at G2/M in plants: yeast mitotic phosphatase cdc25 induces cytokinin-like effects in transgenic tobacco morphogenesis. *Annals of Botany*, 107(7), 1071–1086.
- Lomin, S. N., Yonekura-Sakakibara, K., Romanov, G. A., & Sakakibara, H. (2011). Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 5149–5159.

- Lorenz, O. A., & Maynard, D. N. (1988). *Knott's handbook for vegetable growers* (Issue BOOK). John Wiley & Sons Ltd.
- LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S., & Terzi, M. (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics*, 77(3), 325–331.
- Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (2018). An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1815, pp. 3–13). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1
- Mageau, O. C. (1991). Laboratory design. In *Micropropagation* (pp. 15–29). Springer.
- Maroto Borrego, J. v. (2002). *Horticultura herbácea especial*.
- Méndez Correa, J., & Morfín Cartagena, S. (2006). *Densidad, fertilización y fechas de siembra en repollo (Brassica oleracea var. capitata) en Santa Rosa Uruapan, Michoacán*.
- Mishra, T., Goyal, A. K., & Sen, A. (2015). Somatic embryogenesis and genetic fidelity study of the micropropagated medicinal species, Canna Indica. *Horticulturae*, 1(1), 3–13. <https://doi.org/10.3390/horticulturae1010003>
- Motyka, V., & Kamínek, M. (1990). Regulation of cytokinin catabolism in tobacco callus cultures. In *Progress in plant cellular and molecular biology* (pp. 492–497). Springer.
- Munshi, M. K., Roy, P. K., Kabir, M. H., & Ahmed, G. (2007). In vitro regeneration of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata) through hypocotyl and cotyledon culture. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 17(2), 131–136.
- Neumann, K.-H., Kumar, A., & Imani, J. (2020). Historical Developments of Cell and Tissue Culture Techniques. In *Plant Cell and Tissue Culture—A Tool in Biotechnology* (pp. 13–24). Springer.
- Ngomuo, M., Mneney, E., & Ndakidemi, P. (2013). The effects of auxins and cytokinin on growth and development of (*Musa* sp.) var. “Yangambi” explants in tissue culture. *American Journal of Plant Sciences*, 4(11), 2174.
- Nobécourt, P. (1939). Sur les radicules naissant des cultures de tissus végétaux. *CR Seances Soc. Biol. Ses Fil*, 130, 1271–1272.

- Nongpiur, R., Soni, P., Karan, R., Singla-Pareek, S. L., & Pareek, A. (2012). Histidine kinases in plants: cross talk between hormone and stress responses. *Plant Signaling & Behavior*, 7(10), 1230–1237.
- Nordine, A., Tlemcani, C. R., & el Meskaoui, A. (2014). Regeneration of plants through somatic embryogenesis in *Thymus hyemalis* Lange, a potential medicinal and aromatic plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(1), 19–25.
- Novák, O., Hauserová, E., Amakorová, P., Doležal, K., & Strnad, M. (2008). Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, 69(11), 2214–2224.
- Ohbayashi, I., & Sugiyama, M. (2018). Plant nucleolar stress response, a new face in the NAC-dependent cellular stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2247.
- Ohtani, M., Takebayashi, A., Hiroyama, R., Xu, B., Kudo, T., Sakakibara, H., Sugiyama, M., & Demura, T. (2015). Cell dedifferentiation and organogenesis in vitro require more snRNA than does seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 128(3), 371–380.
- Ördög, V., Stirk, W. A., van Staden, J., Novák, O., & Strnad, M. (2004). Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the Chlorophyta 1. *Journal of Phycology*, 40(1), 88–95.
- Otsuka, K., Mamiya, A., Konishi, M., Nozaki, M., Kinoshita, A., Tamaki, H., Arita, M., Saito, M., Yamamoto, K., & Hachiya, T. (2021). Temperature-dependent fasciation mutants provide a link between mitochondrial RNA processing and lateral root morphogenesis. *Elife*, 10, e61611.
- Ozden, M., & Karaaslan, M. (2011). Effects of cytokinin on callus proliferation associated with physiological and biochemical changes in *Vitis vinifera* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(4), 1451–1459.
- Pasternak, T. P., Prinsen, E., Ayaydin, F., Miskolczi, P., Potters, G., Asard, H., van Onckelen, H. A., Dudits, D., & Fehér, A. (2002). The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology*, 129(4), 1807–1819.

- Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3795–3801.
- Pavlović, S., Vinterhalter, B., Zdravković-Korać, S., Vinterhalter, D., Zdravković, J., Cvikić, D., & Mitić, N. (2013). Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 113(3), 397–406.
- Perea Dallos, M., González, T., Campos Mosos, H. A., Guillot Monroy, G., & Cogua Suárez, J. E. (2009). *Cultivo de tejidos vegetales in vitro: manual de prácticas de laboratorio*.
- Perera, P. I. P., Vidhanaarachchi, V. R. M., Gunathilake, T. R., Yakandawala, D. M. D., Hocher, V., Verdeil, J.-L., & Weerakoon, L. K. (2009). Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 99(1), 73–81.
- Pils, B., & Heyl, A. (2009). Unraveling the evolution of cytokinin signaling. *Plant Physiology*, 151(2), 782–791.
- Planchais, S., Samland, A. K., & Murray, J. A. H. (2004). Differential stability of Arabidopsis D-type cyclins: CYCD3; 1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. *The Plant Journal*, 38(4), 616–625.
- Pooaiah, C. R., Weller, S. C., & Jenks, M. A. (2006). Adventitious shoot regeneration of scotch spearmint (*mentha gracilis* Sole). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(4), 354–358.
- Rademacher, W. (2015). Plant growth regulators: backgrounds and uses in plant production. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(4), 845–872.
- RAMIREZ CEPICIO, S. A. (1994). *Evaluación de 11 cultivares de repollo (Brassica oleraceae L. Var Capitata) en una fecha de trasplante bajo condiciones climáticas de la región de Magdalena, Sonora*.
- Ravanfar, S. A., Aziz, M. A., Rashid, A. A., & Salim, S. (2014). In vitro adventitious shoot regeneration from cotyledon explant of *Brassica oleracea* subsp. *italica* and *Brassica oleracea* subsp. *capitata* using TDZ and NAA. *Pak J Bot*, 46(1), 329–335.

- Reid, J. B., & Ross, J. J. (2011). Mendel's genes: toward a full molecular characterization. *Genetics*, *189*(1), 3–10.
- Šamec, D., Piljac-Žegarac, J., Bogović, M., Habjanič, K., & Grúz, J. (2011). Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) and Chinese (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis* (Lour.)) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. *Scientia Horticulturae*, *128*(2), 78–83.
- Santiago-Lastra, J. A., & Perales-Rivera, H. R. (2007). Producción campesina con alto uso de insumos industriales: el cultivo de repollo (*brassica oleracea* var. *capitata*) en los altos de Chiapas. *Ra Ximhai*, *3*(2), 481–507.
- Santos, J. dos, Pinheiro, M. V. M., Fontana, D. C., Schmidt, D., & Pretto, M. M. (2019). Estabelecimento in vitro de oliveira 'Arbequina' e 'Koroneiki.' *Ciência Florestal*, *29*, 508–518.
- Sarita Valdez, V. (1993). *Guía técnica cultivo de repollo*. Fundación de Desarrollo Agropecuario, Inc.(FDA).
- Sauer, J. D. (1993). Amaranthaceae-amaranth family. *Historical Geography of Crop Plants: A Select Roster*, 9–14.
- Schaller, G. E., Street, I. H., & Kieber, J. J. (2014). Cytokinin and the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology*, *21*, 7–15.
- Scherer, G. F. E. (2002). Secondary messengers and phospholipase A 2 in auxin signal transduction. *Auxin Molecular Biology*, 357–372.
- Schuller, B.-J., & Chelwing-Grzybowska, D. (2006). Swedish agriculture since 1995-productivity and diversification. *Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu*, *8*(6), 123–131.
- Sharan, A. K., Dubey, S. R., Singh, B. P., Kumar, G., & Kumari, S. (2014). Diversity in callus organization in *Eclipta alba* Hassak. *Int J Adv Res*, *2*(7), 465–473.
- Sharma, S., Gambhir, G., & Srivastava, D. K. (2014). High frequency organogenesis in cotyledon and hypocotyl explants of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *National Academy Science Letters*, *37*(1), 5–12.
- Sharp, W. R. (1980). The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Horticultural Reviews*, *2*, 268–310.

- Shekhawat, M. S., Kannan, N., Manokari, M., & Ravindran, C. P. (2015). In vitro regeneration of shoots and ex vitro rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *13*(2), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.08.002>
- Singh, J., Upadhyay, A. K., Bahadur, A., Singh, B., Singh, K. P., & Rai, M. (2006). Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata). *Scientia Horticulturae*, *108*(3), 233–237.
- Skalák, J., Vercruyssen, L., Claeys, H., Hradilová, J., Černý, M., Novák, O., Plačková, L., Saiz-Fernández, I., Skaláková, P., & Coppens, F. (2019). Multifaceted activity of cytokinin in leaf development shapes its size and structure in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *97*(5), 805–824.
- Skirvin, R. M., Chu, M. C., Mann, M. L., Young, H., Sullivan, J., & Fermanian, T. (1986). Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. *Plant Cell Reports*, *5*(4), 292–294.
- Skoog, F., & Miller, C. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. *Vitro Symp Soc Exp Biol*.
- Smith, A. M., Shelton, R. M., Perrie, Y., & Harris, J. J. (2007). An initial evaluation of gellan gum as a material for tissue engineering applications. *Journal of Biomaterials Applications*, *22*(3), 241–254.
- Sparrow, P. A. C., Townsend, T. M., Morgan, C. L., Dale, P. J., Arthur, A. E., & Irwin, J. A. (2004). Genetic analysis of in vitro shoot regeneration from cotyledonary petioles of *Brassica oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics*, *108*(7), 1249–1255.
- Sretenović-Rajičić, T., Ninković, S., Uzelać, B., Vinterhalter, B., & Vinterhalter, D. (2007). Effects of plant genotype and bacterial strain on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Brassica oleracea* L. var. capitata. *Russian Journal of Plant Physiology*, *54*(5), 653–658.
- Srivastava, S., & Dwivedi, U. N. (2001). Plant regeneration from callus of *Cuscuta reflexa*—an angiospermic parasite—and modulation of catalase and peroxidase activity by salicylic acid and naphthalene acetic acid. *Plant Physiology and Biochemistry*, *39*(6), 529–538.

- Steward, F. C., Mapes, M. O., & Mears, K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 705–708.
- Stickens, D., Tao, W., & Verbelen, J.-R. (1996). A single cell model system to study hormone signal transduction. In *Plant Hormone Signal Perception and Transduction* (pp. 233–238). Springer.
- Su, Y. H., Liu, Y. B., Bai, B., & Zhang, X. S. (2015). Establishment of embryonic shoot–root axis is involved in auxin and cytokinin response during Arabidopsis somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 5, 792.
- Su, Y. H., Tang, L. P., Zhao, X. Y., & Zhang, X. S. (2021). Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. In *Journal of Integrative Plant Biology* (Vol. 63, Issue 1, pp. 228–243). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jipb.12972>
- Su, Y.-H., Liu, Y.-B., & Zhang, X.-S. (2011). Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, 4(4), 616–625.
- Sugimoto, K. (2015). Plant cell reprogramming as an adaptive strategy. *Journal of Plant Research*, 128(3), 345–347.
- Sugiyama, M. (2015). Historical review of research on plant cell dedifferentiation. *Journal of Plant Research*, 128(3), 349–359.
- Taylor, N. J., Stirk, W. A., van Staden, J., & Bornman, C. H. (2003). The elusive cytokinin biosynthetic pathway. *South African Journal of Botany*, 69(3), 269–281.
- Terzi, M., & Loschiavo, F. (1990). Somatic embryogenesis. *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, 19, 54–66.
- Thompson, T. L., Doerge, T. A., & Godin, R. E. (2000). Nitrogen and Water Interactions in Subsurface Drip-Irrigated Cauliflower I. Plant Response. *Soil Science Society of America Journal*, 64(1), 406–411.
- THORPE, T. A. (1990). The current status of plant tissue culture. In *Developments in crop science* (Vol. 19, pp. 1–33). Elsevier.
- Torres, K. C. (1989). Application of Tissue Culture Techniques to Horticultural Crops. In *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops* (pp. 66–69). Springer.
- Tran, L.-S. P., & Pal, S. (2014). *Phytohormones: a window to metabolism, signaling and biotechnological applications*. Springer.

- Utami, E. S. W., & Hariyanto, S. (2020). Organic compounds: contents and their role in improving seed germination and protocorm development in orchids. *International Journal of Agronomy*, 2020.
- Vasil, I. K., & Thorpe, T. A. (2013). *Plant cell and tissue culture*. Springer Science & Business Media.
- Verma, A., Malik, C. P., Gupta, V. K., & Sinsinwar, Y. K. (2009). Response of groundnut varieties to plant growth regulator (BAP) to induce direct organogenesis. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5(3), 313–317.
- Vieira, P., de Clercq, A., Stals, H., van Leene, J., van de Slijke, E., van Isterdael, G., Eeckhout, D., Persiau, G., van Damme, D., & Verkest, A. (2014). The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP6 induces mitosis and impairs cytokinesis in giant cells induced by plant-parasitic nematodes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26(6), 2633–2647.
- Vigliola, M. I. (2010). *Horticultura Ilustrada: con orientación ecológica* (Issue 635). Hemisferio Sur,.
- Vinterhalter, D., Sretenović-Rajičić, T., Vinterhalter, B., & Ninković, S. (2007). Genetic transformation of Brassica oleracea vegetables. *Transgenic Plant J*, 1(2), 340–355.
- White, P. R. (1939). Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *American Journal of Botany*, 59–64.
- Wilmoth, J. C., Wang, S., Tiwari, S. B., Joshi, A. D., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Reed, J. W. (2005). NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *The Plant Journal*, 43(1), 118–130.
- Wulfetange, K., Lomin, S. N., Romanov, G. A., Stolz, A., Heyl, A., & Schmülling, T. (2011). The cytokinin receptors of Arabidopsis are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology*, 156(4), 1808–1818.
- Xu, C., Cao, H., Xu, E., Zhang, S., & Hu, Y. (2018). Genome-wide identification of Arabidopsis LBD29 target genes reveals the molecular events behind auxin-induced cell reprogramming during callus formation. *Plant and Cell Physiology*, 59(4), 749–760.
- Xu, J., Hofhuis, H., Heidstra, R., Sauer, M., Friml, J., & Scheres, B. (2006). A molecular framework for plant regeneration. *Science*, 311(5759), 385–388.

- Xu, L., & Huang, H. (2014). Genetic and Epigenetic Controls of Plant Regeneration. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 108, pp. 1–33). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391498-9.00009-7>
- Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T., & Mizuno, T. (2001). The Arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology*, *42*(9), 1017–1023.
- Yang, J., Li, G., Hu, S., Bishopp, A., Heenatigala, P. P. M., Kumar, S., Duan, P., Yao, L., & Hou, H. (2018). A protocol for efficient callus induction and stable transformation of *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden using *Agrobacterium tumefaciens*. *Aquatic Botany*, *151*, 80–86.