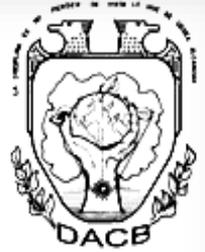




**Universidad Juárez Autónoma de Tabasco**

*“Estudio en la duda acción en la fe”*

**División Académica de Ciencias Biológicas**



**Propagación *in vitro* de *Vallisneria americana* Michx.  
por embriogénesis**

**Tesis**

*Que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias Ambientales*

Presenta la

**Biol. Yesenia Lisbeth Gutiérrez de la Cruz**

Director de Tesis

**Dra. Violeta Ruiz Carrera**

VILLAHERMOSA, TABASCO, 2016.



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECCIÓN**



AGOSTO 15 DE 2016

**C. YESENIA LISBETH GUTIÉRREZ DE LA CRUZ  
PAS. DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES  
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales titulado: **"PROPAGACIÓN IN VITRO DE VALLISNERIA AMERICANA MICHX POR EMBRIOGÉNESIS"**, asesorado por la Dra. Violeta Ruiz Carrera sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por el Dr. Alberto de Jesús Sánchez Martínez, Dr. José Ángel Gaspar Génico, Dra. Violeta Ruiz Carrera, M. en C. María de los Ángeles Guadarrama Olivera y M.E.S. Elda Falconi de la Fuente.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E  
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE**

**M. EN C. ROSA MARTHA PADRON LOPEZ  
DIRECTORA**

C.c.p.- Expediente del Alumno.  
C.c.p.- Archivo

**UJAT  
DIVISIÓN ACADÉMICA  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DIRECCIÓN**

Miembro CUMEX desde 2008

**Consortio de  
Universidades  
Mexicanas**  
UNA ALIANZA DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

**KM. 0.5 CARR. VILLAHERMOSA-CÁRDENAS ENTRONQUE A BOSQUES DE SALOYA**  
Tel. (993) 358-1500 Ext. 6400, Fax (993) 354-4308 y 358-1579 E-mail: dirección.dacbiol@ujat.mx

Usar papel reciclado economiza energía, evita contaminación y despilfarro de agua y ayuda a conservar los bosques

## CARTA AUTORIZACIÓN

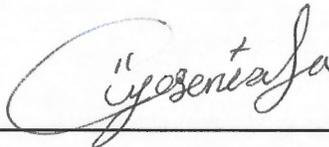
El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **“PROPAGACIÓN IN VITRO DE VALLISNERIA AMERICANA MICHX POR EMBRIOGÉNESIS”**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el Día 15 de Agosto de 2016.

AUTORIZO



---

YESENIA LISBETH GUTIÉRREZ DE LA CRUZ

## ***Agradecimientos***

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado, al ser becaria. A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco en la División Académica de Ciencias Biológicas por permitirme estudiar en sus instalaciones. A la Dra. Ena Edith Mata Zayas Jefa del Posgrado por sus atenciones y gestión de término en proceso de obtención del grado.*

*Deseo expresar mi profundo agradecimiento por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado, el haber sido consejera de mi tesis y estar siempre dispuesta atenderme, brindarme su consejo, por todos esos conocimientos aportados para la realización de esta investigación con su paciencia, amistad, y producción intelectual a la **Dra. Violeta Ruiz Carrera.***

*Al **Dr. Alberto de Jesús Sánchez Martínez** por la confianza depositada en mí, apoyo técnico, con sus comentarios para el enriquecimiento y colaboración de la investigación.*

*Al **Dr. José Ángel Gaspar Génico** quien contribuyo en los momentos de lucha de los detalles de la vida con sincera amistad, y en relación técnica como asesor en la revisión detallada del trabajo.*

*A la **M.C. Elda Falconi de la Fuente** por ser mi asesor revisor en el trabajo final de investigación, sus conocimientos transmitidos en sus clases y colaboración sincera en la revisión de esta tesis.*

*A la **Dra. María de los Ángeles Guadarrama.** Por realizar observaciones y recomendaciones de la tesis.*

*Al **Dr. Alfonso Azpeitia Alvarado** por acceder a la investigación aplicada, brindarme su amistad, sus conocimientos y tiempo aportado durante mi estancia en el área de Biología molecular en la INIFAP, en el campo experimental, Huimanguillo, Tabasco.*

## ***Agradecimientos***

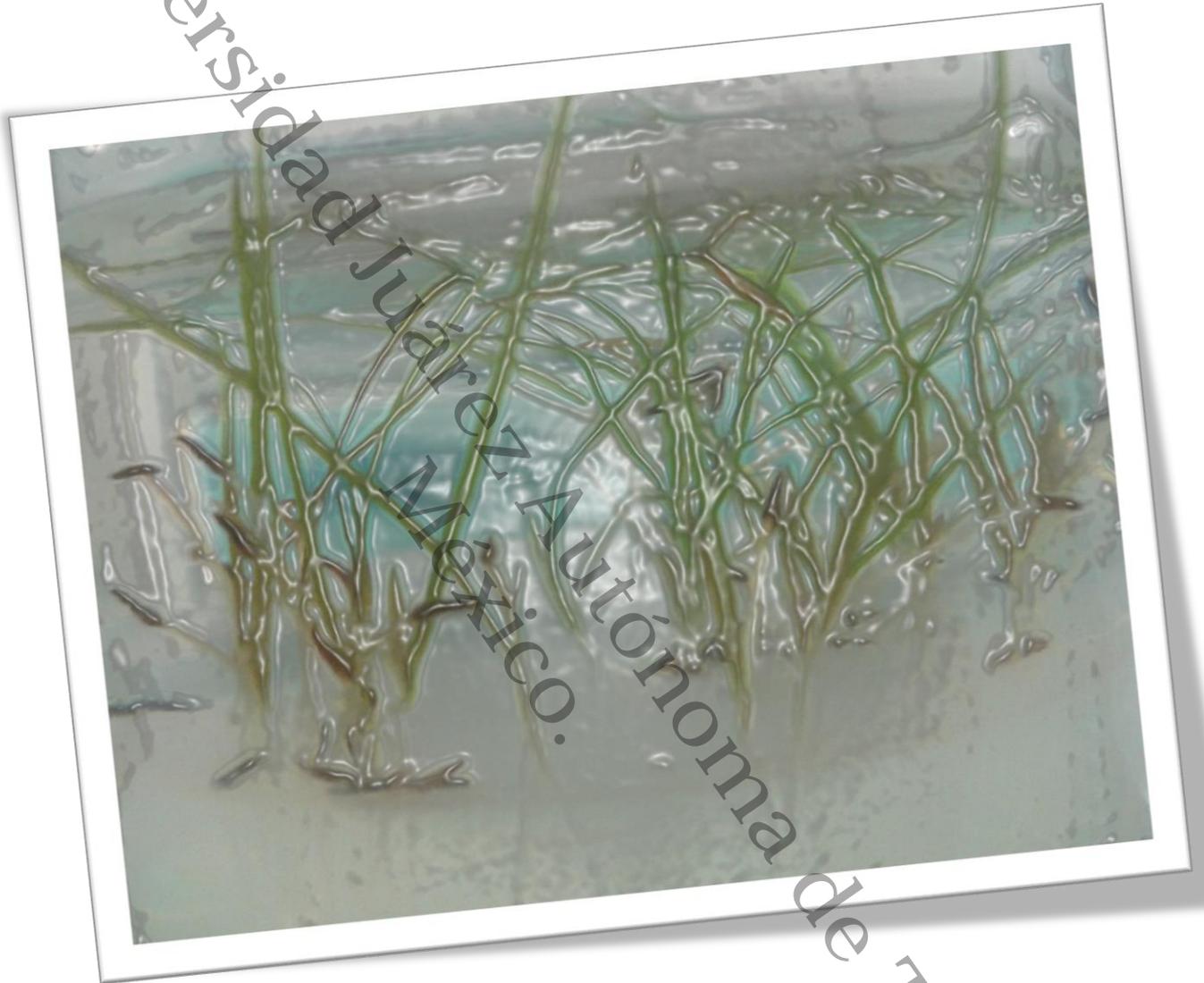
*Al Dr. Luis José Rangel Ruiz y la Mtra. Jaquelina Gamboa Aguilar del laboratorio de Malacología de la DACBiol-UJAT por el apoyo en el uso del estereomicroscopio.*

*A mis padres y hermana y mi queridísimo padrino por su amor y felicidad brindada, a quienes también dedico este trabajo... Además quiero agradecer a las personas que estimularon a la reflexión en la mejora de la calidad técnica y humana del trabajo en la investigación. A docentes, amigos colegas por sus profundas palabras en el reconocimiento de la construcción metodológica del quehacer científico en el campo biológico, así mismo en otras áreas y en otros ámbitos, pero con sus contribuciones personales y anhelos mismos para luchar por una meta que si bien es intelectual, también como aporte en la calidad humana. A los compañeros de la Maestría. Así mismo a los que compartieron durante mi estancia el gusto del trabajo de laboratorio de Biotecnología Vegetal (Paty, Félix, Jesús, Geni y Daniel).*

*El recorrido no fue fácil, la luz divina de Dios se hacía presente, y he dejado estas líneas para expresar, aunque breve lo grandioso que ha sido mi Padre para conmigo, por permitirme llegar hasta este momento y dar gracias por todo lo que he recibido de sus misericordiosas manos.*

Propagación *in vitro* de *Vallisneria americana*

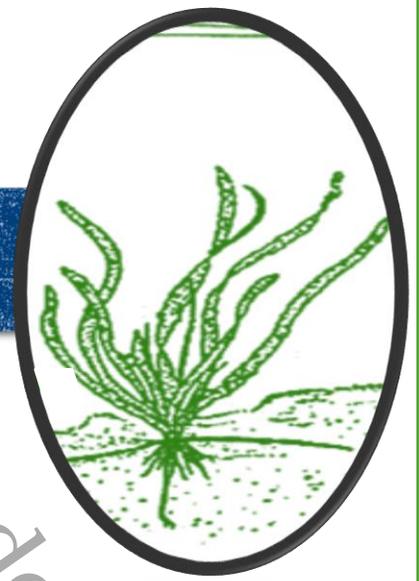
Michx por embriogénesis indirecta



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## Índice



<b>Resumen general</b>	1
<b>Capítulo I. Introducción general</b>	
Introducción	2
Antecedentes	
Generalidades de <i>Vallisneria americana</i>	4
Técnicas para la repoblación de angiospermas sumergidas	4
Embriogénesis somática (ES)	5
Justificación	8
Hipótesis	9
Objetivos	
General	9
Específicos	9
Literatura citada	10
<b>Capítulo II. Sensibilidad de <i>Vallisneria americana</i> (Michx) a fitoreguladores en la inducción embriogénica</b>	
Introducción	16
Materiales y métodos	17
Resultados	18
Discusión	19
Literatura citada	21
Índice de figura	25
<b>Capítulo III. Comparación de respuestas celulares embriogénicas de <i>Vallisneria americana</i></b>	
Introducción	30
Materiales y métodos	31
Resultados	32
Discusión	33
Conclusión	35
Literatura citada	35
Índice de figuras	39
<b>Capítulo IV. Conclusiones generales</b>	45

## Abreviaturas

2, 4-D Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

AIA Ácido indol-3-acético

AIB Ácido indol-3-butírico

ANA Ácido-naftalenacético

BAP Bencilaminopurina

BGA Base de germinado aislado

BGC Base de germinado completo

BRA Base de rameto aislada

BRC Base de rameto completo

CE Callo embriogénico

Es Embrión somático

ES Embriogénesis somática

d días

FR Fitorregulador

KIN Kinetina

MPEs Masas proembriogénicas (tipo I)

PIC Picloram

p/v peso/volumen

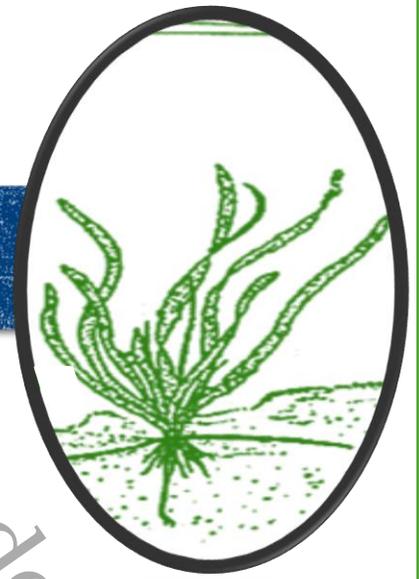
TDZ Tiazuron

v/v volumen/volumen

Z Zeatina

Universidad Juárez Autónoma  
México.  
Autónoma de Tabasco.

## Resumen general



## **Resumen general**

Los métodos de repoblación sustentable son urgentes en los humedales que registran declinación de vegetación acuática sumergida por estrés abiótico. En *Vallisneria americana*, el protocolo de inducción directa de embriones somáticos fue optimizado en medio de cultivo MS (0.5X) líquido y heterótrofo para analizar el efecto de los fitoreguladores (FR) 2,4-D, BAP y TDZ, separar la influencia de la complejidad de la base caulinar, así como para masificar las masas proembriogénicas a través de sistemas de embriogénesis de alta frecuencia.

La asepsia y sensibilidad de las bases caulinares de germinados, aislada y usando el germinado completo, a los fitoreguladores individuales se evaluó en concentraciones de 2,4-D de 1 y 2 mg L<sup>-1</sup> y BAP y TDZ de 0.6 X 10<sup>-3</sup> y 0.6 x 10<sup>-5</sup> mg L<sup>-1</sup> con un control de MS. Las respuestas de células suspendidas, callo café, callo crema, película de células adherida a la superficie del recipiente, medio oleoso y contaminación (expresadas en % de cultivos) se registraron cada semana durante 30 días. El 77-98 % de los cultivos de explantes aislados y completos presentaron asepsia similar y predominio de células suspendidas procedentes de callo embriogénico. Las condiciones *in vitro* que promovieron sensiblemente las dispersiones celulares embriogénicas en base caulinar aislada fueron 2,4-D elevado y TDZ bajo y en la base compleja fue BAP bajo; mientras que en el resto los tratamientos y en el control de ambos explantes, las suspensiones celulares inespecíficas estuvieron presentes en mayor porcentaje.

Los resultados de la sensibilidad obtenida en las bases de germinados se utilizaron para mejorar el diseño experimental de inducción celular embriogénica usando las bases caulinares de germinados y rametos, aisladas y completas. En condiciones de cultivo *in vitro* anteriormente indicadas fue evaluada la complejidad entre bases caulinares de germinados y las de rametos bajo los efectos interactivos de la auxina 2,4-D de 2 mg L<sup>-1</sup> y de las citocinas BAP de 1 mg L<sup>-1</sup> y TDZ de 0.6x10<sup>-3</sup>, así como por sus concentraciones individuales. En los cultivos se formó callo embriogénico por vía indirecta, masas proembriogénicas que desarrollaron hasta embriones, así como células suspendidas. El proceso embriogénico de *V. americana* fue sobresaliente en bases caulinares de germinados aisladas y complejas con el suministro individual de 2,4-D y en menor magnitud de TDZ, por presentar mejores dispersiones celulares para obtener los cultivos embriogénicos de alta frecuencia.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## Capítulo I.

Introducción general



## INTRODUCCIÓN

Las angiospermas sumergidas enraizadas representan un componente clave para mantener los servicios ambientales en los ecosistemas acuáticos (Hobbs y Harris 2001), ya que juegan un papel relevante en la dinámica trófica, benefician la abundancia y diversidad de la fauna acuática asociada, y la purificación del agua (Sánchez *et al.* 2012). Sin embargo, la vegetación sumergida comparte problemáticas ecológicas similares en los ecosistemas de limnéticos, estuarinos y marinos (Ailstock y Shafer 2006, Orth *et al.* 2006, 2010, Roca *et al.* 2016, Wuang *et al.* 2016, McSkimming *et al.* 2016); donde presentan registros de declinación drástica o pérdida y los escenarios de manejo para su restablecimiento han sido desfavorables y complicados (Dewsbury *et al.* 2016).

Las causas de la vulnerabilidad de la vegetación acuática sumergida han estado más asociadas a factores antrópicos con efectos de forma periódica y circunstancial, como la eutrofización, salinización, sobrepesca y navegación que a los naturales como la dinámica del ambiente (del Milenio EDLE 2005, Sánchez *et al.* 2007, Sánchez *et al.* 2012, Ogdahl y Steinman 2015, Roca *et al.* 2016). Existe consenso mundial que la recuperación del hábitat de vegetación acuática es clave para sustentar la operatividad de un programa de manejo en los ecosistemas acuáticos impactados (Best *et al.* 2008, Pan *et al.* 2016); así, los estudios de la vegetación acuática sumergida promueven el cuidado de los bienes y servicios de los ecosistemas acuáticos (Sánchez *et al.* 2007, Porrier *et al.* 2010). Sin embargo, la repoblación de angiospermas acuáticas sumergidas a través del trasplante de organismos de poblaciones donadoras naturales no ha sido exitosa por presentar variación genética reducida y por los procedimientos mecánicos invasivos que se usan en la extracción de material vegetal original (Kujawshi y Thompson 2000), no se ajustan al paradigma general de gestión de recuperación en los humedales (Poirrier *et al.* 2010).

Incluso la ventaja de la dispersión de semillas, que comienza a ser el método de siembra más aplicado en diversos proyectos de repoblación, presenta también limitaciones de índole ecológica y complicaciones tecnológicas (Iriondo 2001, O' Donnell *et al.* 2016).

En los humedales costeros del territorio mexicano, ha sido registrada la vulnerabilidad de angiospermas sumergidas, pero sin reportes de alguna acción de repoblación emprendida (Sánchez y Barba 2005, Sánchez *et al.* 2007, Ruiz-Carrera y Sánchez 2012a). En el caso del humedal fluvial



Pantanos de Centla, la producción de plantas de *Vallisneria americana* para iniciar proyectos de repoblación se está enfrentando mediante tecnologías *in vitro* (Cruz 2010, Ruiz-Carrera y Sánchez 2008, 2012a y 2012b).

La tecnología *in vitro* favorece la propagación masiva de plantas asépticas, en menor tiempo y en espacios reducidos; aunque es más reciente su aplicación en especies de angiospermas sumergidas (Kujawshi y Thompson 2000, Ke y Li 2006, Ruiz-Carrera y Sánchez 2014). Además, el sistema *in vitro* permite el desarrollo de los estudios sobre la biología básica y reproductiva de estas especies enfocadas a mejorar su propagación *in vitro* (Ailstock y Shafer 2006, Ke y Li 2006, Marion y Orth 2010, Cruz-Cruz *et al.* 2013). La propagación *in vitro* por las vías de organogénesis y embriogénesis somática (ES) conducen a la morfogénesis (Davey y Anthony 2010). Ambas vías, representan una enorme capacidad de multiplicación en angiospermas sumergidas, ya que a partir de estructuras pequeñas se generan propágulos con ápice y raíz, o semillas desnudas. La tecnología *in vitro* por embriogénesis somática resulta el método prometedor para masificar plantas de *V. americana* porque incrementa la posibilidad de suministrar germoplasma sustentable para la repoblación de ecosistemas sin restricciones ambientales normativas de bioseguridad (CIBIOGEM 2010).



## ANTECEDENTES

### Generalidades de *Vallisneria americana*

*Vallisneria americana* Michx es una angiosperma acuática sumergida arraigada al sustrato arcilloso, arenoso o ambos (Moore y Jarvis, 2007, Ruiz-Carrera y Sánchez 2012b). La colonización de esta especie se ve reducida en altas condiciones de salinidad y turbidez, ya que su hábitat preferencial es oligohalino (Novelo 2006, Moore y Jervis 2007). La especie es considerada indicadora de enriquecimiento de nutrientes (Benson *et al.* 2008).

La especie es dioica, perenne y con formas de reproducción por semillas, rizomas y estolones (Novelo 2005 y 2006). La floración y la fructificación típicamente ocurre en verano produciendo aproximadamente unas 168 semillas por fruto; y la producción de semillas depende de la extensión de la población siendo su rango de 1,000 m<sup>2</sup> a 16,000 m<sup>2</sup>. *Vallisneria americana* presenta flores pistiladas que elongan hacia la superficie del agua (Moore y Jarvis, 2007). La especie muestra distribución amplia y es representativa en varios ecosistemas acuáticos de Norte y Centro América, en el Atlántico y el Golfo de México y en interiores de Nueva Escocia y Sur de Dakota, Asia y Australia (Moore y Jarvis, 2007, Les *et al.* 2008). En la República mexicana se encuentra en los estados de: Campeche, México, Morelia, Quinta Roo, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz (Lot *et al.* 1986, Novelo 2006). Sin embargo, las poblaciones de *V. americana* presentan declinación masiva o desaparición progresiva (Sánchez *et al.* 2007 y 2012, Ruiz-Carrera y Sánchez 2012a).

*Vallisneria americana* es una especie valiosa por las diversas funciones ecológicas que redundan en servicios ambientales del ecosistema acuático, como los humedales (RAMSAR 2000). En el ecosistema sus poblaciones incrementan la disponibilidad de alimentos, ya que funcionan como hábitat que provee sustrato y aportan detritus, refugio y área de cría, reclutamiento de organismos asociadas a la actividad pesquera de los habitantes de la zona del sitio RAMSAR, Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla (Arévalo y Mendoza 2012 y Sánchez *et al.* 2012).

### Técnicas para la repoblación de angiospermas acuáticas

La dispersión de semillas y la propagación in vitro son las técnicas más recientes que se están explorando a gran escala para repoblar angiospermas acuáticas como: Posidonia oceánica,



Vallisneria, americana y Zostera marina (Balestri y Bertini 2003, Zhongqiang et al. 2005, Ailstock y Shafer 2006, Ke y Li 2006, Moore y Jarvis 2007, Schloesser y Manny 2007, Marion y Orth 2010, Zarranz et al. 2010, Kauth y Biber 2015, Cai et al. 2016). La propagación de angiospermas de ecosistemas marinos y estuarinos ha recibido mayor atención que los limnéticos. Aunque permanentemente se están mejorando las tecnologías para determinar el medio de cultivo y las condiciones óptimas de propagación *in vitro* (Davey y Antony 2010), que por métodos biotecnológicos se efectúa la conservación de plantas (Cruz-Cruz 2013).

La enmarcada importancia de conservar la biodiversidad mediante métodos efectivos de preservación de variabilidad genética y de repoblación por medio de técnicas de cultivo *in vitro* ofrece un potencial amplio para la reproducción y multiplicación de Embrión somático (Es) a partir de suspensiones celulares embriogénicas mediante la evaluación de explantes y fitorreguladores (Freire 2003, Zarranz 2010, Hernández, 2012, Mukul-López et al 2012, Espinoza 2014, Subhashini 2014).

### **Embriogénesis somática (ES)**

La ES un proceso celular *in vitro* que potencializa la totipotencia y la competencia de células haploides o diploides, principalmente de las células de tejidos vegetales jóvenes (explantes) para formar una nueva planta (Pierik 1990), solo basta tener células competentes para responder a las vías de la ES. Esta vía de regeneración somaclonal, es empleada como herramienta de conservación y mejoramiento genético vegetal.

El método de ES ha favorecido la obtención de germoplasma de genotipos modelos que regeneran *in vitro* con poca dificultad (Zavattieri et al. 2010). Este proceso de regeneración requiere de dos fases, inducción embriogénica y expresión de los embriones resultantes (Freire 2003). La diferenciación celular o su inhibición depende del genotipo, su potencial embriogénico y para ser responsivo se necesita la participación de los reguladores de crecimiento (Zavattieri et al. 2010). La inducción de las células a embriones somáticos necesita la señal de auxina o citocinina, o ambos para la polarización celular, la división asimétrica y la reorganización celular, como ocurre con su homólogo cigótico (Fehér 2008, Pagnussat et al. 2009, Gutiérrez-Mora et al. 2012).



El embrión somático pasa por los estados de desarrollo y diferenciación igual que el tipo cigótico, hasta alcanzar el estado cotiledonar (George *et al.* 2008). Por lo tanto, las fases críticas de la ES, son la polaridad del cigoto y su elongación, la activación del genoma, la división del cigoto, la separación de la célula basal y apical, la diferenciación de la hipófisis y formación de la raíz, del protodermo y radial, meristemo y la iniciación cotiledonar (Lau *et al.* 2012). En *Picea abies* se analizaron tres líneas celulares para el desarrollo Es, y se encontró con metabolitos significativos para el desarrollo del Es, lo que indica una señalización de bloqueo de auxina endógena y el azúcar en etapas iniciales del desarrollo del Es, estrés por la presencia de metabolitos estimulantes de la etapa tardía del embrión (Businge *et al.* 2012). El dominio apical del embrión si es adecuado, prolifera y, finalmente, da lugar a la plántula, mientras que la parte basal, el suspensor del embrión y cuando ocurre la diferenciación terminal, se elimina poco a poco a través de la muerte celular programada (Smertenko y Bozhkov, 2014). A partir de suspensiones celulares de líneas no embriogénicas y líneas inducidas embriogénicamente de las especies *Coffea canephora* y *C. arabica* se identificaron un total de 173 las proteínas secretadas, de ambos cultivos, destacando que algunas exclusivas de las condiciones embriogénicas y otras de condición no embriogénica (Mukul-López *et al.* 2012).

El proceso de la ES requiere diferentes concentraciones y combinaciones de fitoreguladores en diferentes etapas con el fin de producir finalmente el embrión. Las etapas más importantes, inducción embriogénica, proliferación de productos embriogénicos y desarrollo de embriones, se benefician por relación de los nutrientes presentes en medio de cultivo, la adición de nitrógeno en este, las condiciones de incubación, los FR, y por la presencia de varias sustancias secretadas por las células somáticas (Gutiérrez-Mora *et al.* 2012, Mukul-López *et al.* 2012). Además la ES como herramienta de esclarecimiento de los procesos celulares, bioquímicos y moleculares que se llevan a cabo durante el desarrollo de embriones (Mukul-López *et al.* 2012, Smertenko y Bozhkov 2014).

Las fitoreguladores son fitohormonas que actúan como señales químicas en varias zonas del cuerpo de la planta en concentraciones relativamente bajas y se transportan a través el sistema vascular para activar diversas respuestas celulares y fisiológicas; pero altas concentraciones inhiben su acción. De acuerdo con su acción fisiológica los fitoreguladores que funcionan como auxina natural son ácido indol-3-acético (AIA) y ácido indol-3-butírico (AIB) y entre los sintéticos se encuentran el



ácido-naftalenacético (ANA), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), etc. (Freire 2003, Pierik *et al.* 1990). La citocinina natural más usada es la zeatina, en los sintéticos se encuentran la KIN, tidiazuron (TDZ), benciladenilpurina (BAP) (Gutiérrez-Mora *et al.* 2012). Los FR sintéticos muestran una actividad similar o mayor a las hormonas endógenas.

En la ES *in vitro*, las citocininas se utilizan en combinación con auxinas y desempeñan un papel importante en la proliferación celular. Los FR de plantas son críticos en la determinación de la vía celular de la ES y sus efectos se han estudiado en una variedad de especies reducidas de plantas (Gutiérrez-Mora *et al.* 2012).

En varias angiospermas acuáticas (*Anthurium andraeanum*, *Oryza sativa*, *Oryza australiensis*, *Typha domingensis* y *Vallisneria americana*), ha sido favorable la inducción y desarrollo de embriones somáticos (Blackhall *et al.* 1999, Álvarez 2007, Del Rivero *et al.* 2008, Zarranz 2010, Hernández 2012, Espinoza 2014), pero en las dos últimas la obtención del sistema embriogénico de alta frecuencia no ha sido exitoso. En la inducción embriogénica se han aplicaron concentraciones de 0, 1 y 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D en el medio de cultivo MS (0.5X) a pH de 5.8 suplementado de sacarosa al 1 y 3% (Álvarez, 2007). En este primer esfuerzo de investigación la embriogénesis de *V. americana* fue ubicada sobre la base caulinar del germinado. Los resultados fueron prometedores por la identificación de las masas proembriogénicas (MPEs) y su estado de transdiferenciación a embrión somático (Álvarez 2007). Sin embargo, el sistema de cultivo reportó baja eficiencia embriogénica y fue impreciso en relación a la ruta del proceso embriogénico. El método de alta frecuencia embriogénica requiere de dos etapas de cultivo, una para iniciar los callos embriogénicos (CE) y el subcultivo para desarrollar la ES de células embriogénicas.

En este trabajo la investigación fue enfocada hacia la proliferación de estructuras y células embriogénicas, ensayando diferentes auxinas y citocininas sobre base caulinar aislada y compleja para guiar el proceso embriogénico de *Vallisneria americana* a sistemas de alta frecuencia.



## JUSTIFICACIÓN

La presente propuesta está sustentada en la necesidad de mitigar o rehabilitar globalmente ecosistemas del Atlántico occidental y localmente a Pantanos de Centla por la condición de elevada vulnerabilidad que reporta la vegetación acuática sumergida. La rehabilitación de Pantanos de Centla mediante la repoblación de la angiosperma acuática dominante *V. americana* es urgente por los diversos servicios ambientales que ésta brinda como fuente de alimentación, reproducción y protección para las especies acuáticas relacionadas, además de su función en la captación y limpieza del exceso de nutrientes aportados por la contaminación antropogénica.

El desarrollo de protocolos de propagación *in vitro* por ES de angiospermas sumergidas es estratégica por la necesidad de contar con métodos de siembra fluida desvinculado al suministro de semillas del ecosistema. La limitada capacidad de crecimiento *ex situ* de estas plantas y la necesidad de producirlas en grandes cantidades para los programas de rehabilitación sin afectar las poblaciones *in situ* justifican esta investigación.

En *Vallisneria americana*, hay avances en la producción de células embriogénicas (callo embriogénico) hasta el desarrollo de masas proembriogénicas. La producción de mayor número de callos por vía heterótrofa se obtuvo con tratamientos en relación 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 3% de sacarosa en ambientes de obscuridad, después de 30 días de cultivo (Álvarez 2007). La transferencia de los productos a medio fresco con 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 3% de sacarosa, sin fitoreguladores, produjo MPEs sobre el explante. Sin embargo, el método requiere ser mejorado por la baja frecuencia y asincronía en el proceso embriogénico, lo que implica seleccionar el cultivo de las células suspendidas y derivadas de callo o MPEs. La eficiencia de la ES requiere de la multiplicación de callo friable por ser la etapa clave para guiar el proceso de la ES por la vía de dispersiones celulares, ya que garantiza la (ES indirecta) en consecuencia lograr la multiplicación de Es en sistemas de alta frecuencia. Comparada a otras técnicas biotecnológicas, la ES indirecta presenta ventajas en la proliferación, sincronización celular, hasta la formación de Es. El desarrollo del protocolo de propagación ES de *V. americana* es importante debido a su limitada capacidad de crecimiento *ex situ* y a la necesidad de producir las plantas en grandes cantidades para los programas de rehabilitación sin afectar las poblaciones *in situ*.



## HIPÓTESIS

La embriogénesis somática de *Vallisneria americana* será mejorada por la vía de proliferación de células embriogénicas mediante la interacción de la auxina 2,4-D con citocininas, como el BAP y el TDZ a partir de la base caulinar aislada del germinado o del rameto, como alternativa para la masificación de embriones.

## OBJETIVOS

### General

Mejorar el proceso de embriogénesis somática indirecta de *V. americana* usando bases caulinares de germinados y rametos *in vitro* frente a auxinas y citocininas.

### Específicos

- ❖ Analizar la vía de embriogénesis indirecta en bases aisladas y de la planta juvenil y adulta completas.
- ❖ Caracterizar la eficiencia aséptica y la sensibilidad del material vegetal.
- ❖ Evaluar efectos individuales y combinados de los fitoreguladores 2,4-D, BAP y TDZ en la etapa de inducción embriogénica.
- ❖ Identificar condiciones de cultivo que favorecen la proliferación de células embriogénicas.



LITERATURA CITADA

- Ailstock S, Shafer D (2006) Applications and limitations of micropropagation for the production of underwater grasses ERDC/TN SAV-06-1
- Álvarez GAL (2007). Inducción directa de embriones somáticos de *V. americana*. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México
- Arévalo FWDC, Carranza M (2012) Larvas y juveniles de peces en ambientes estuarinos de la Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla y su zona costera adyacente. Recursos acuáticos costeros del sureste. p. 242-269.
- Balestri E, Bertini S (2003) Growth and development of *Posidonia oceanica* seedlings treated with plant growth regulators: possible implications for meadow restoration. *Aquatic Botany* 76(4): 291-297.
- Benson RE, O'Neil MJ, Dennison CW (2008) Using the aquatic macrophyte *Vallisneria Americana* (wil celery) as a nutrient bioindicator. *Hydrobiology* 596: 187-196.
- Best EPH, Teeter AM, Landwehr KJ, James WF, Nair SK (2008) Restoration options for potential persistence of submersed aquatic vegetation: combining ecological, hydrodynamic and sediment transport modelling. *Freshwater Biology* 53: 814-826.
- Blackhall WN, Jotham JP, Power JB, Lowe KC, Cocking EC, Davey MR (1999) Callus initiation, maintenance, and shoot induction in rice. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 111: Plant Cell Culture Protocols. Humana Press. 421 pp.
- Businge E, Brackmann K, Moritz T, Egertsdotter U (2012) Metabolite profiling reveals clear metabolic changes during somatic embryo development of Norway spruce (*Picea abies*). *Tree Physiology* 32(2): 232-244.
- Cai X, Yao L, Gao G, Xie Y, Yang J, Tang X, Zhang M (2016) Responses in root physiological characteristics of *Vallisneria natans* (Hydrocharitaceae) to increasing nutrient loadings. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 417: 4.
- CIBIOGEM (2010) Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. [http://cibiogem.gob.mx/Norm\\_leyes/paginas/ley\\_bioseguridad.aspx](http://cibiogem.gob.mx/Norm_leyes/paginas/ley_bioseguridad.aspx) (modificado 26/04/2010).
- Cruz-Cruz CA, González-Arno MT, Engelmann F (2013) Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources* 2(2): 73-95
- Davey MR, Anthony P (2010) Plant Regeneration. *Plant Cell Culture: Essential Methods*. John Wiley y Sons, Ltd, Chichester, UK.



- Del Milenio EDLE (2005) Los ecosistemas y el bienestar humano: humedales y agua. Informe de Síntesis World Resources Institute, Washington, DC.
- Del Rivero BN, Peñalver DA, Rodríguez RB, Chiu WC, López RC, Ferry FJ, Martínez OG (2008) Embriogénesis somática en (*Anthurium andraeanum* Lind.) variedad "LAMBADA". Ra Ximhai: Revista Científica de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sostenible 4(1): 135-150.
- Espinoza VAF (2014) Propagación clonal *in vitro* de anturio *Anthurium andraeanum* a través de callo ú organogénesis indirecta. Tesis de pregrado. UTMACH, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Machala, Ecuador En: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/920>
- Dewsbury BM, Bhat M, Fourqurean JW (2016) A review of seagrass economic valuations: Gaps and progress in valuation approaches. *Ecosystem Services* 18: 68-77.
- Fehér A (2008) The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. *Acta Biological Szeged* 52(1): 53-56.
- Freire SM. (2003) Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal* 3(4): 195-209
- Freire SM (2009) Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Reseña bibliográfica. *Biotecnología vegetal* 3(4):195-2009.
- George FE, Hall AM, De Klerk G (Eds.) (2008) Plant propagation by tissue culture. Cap. 9. Somatic embryogenesis. 3<sup>rd</sup> edition 335-354 pp. [http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4020-5005-3\\_9#page-1](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4020-5005-3_9#page-1)
- Gutiérrez-Mora A, González-Gutiérrez AG, Rodríguez-Garay B, Ascencio-Cabral A, Li-Wei L (2012) Plant somatic embryogenesis: some useful considerations. INTECH Open Access Publisher
- Hernández P G (2012) Embriogénesis somática de *Typha domingensis*. Tesis de Maestría. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.
- Hobbs RH, Harris JA (2001) Restoration ecology: Repairing the earth's ecosystems in the new millennium. *Restoration Ecology* 9: 239-246.
- Iriondo JM (2001) Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Investigación Agraria. Producción y protecciones vegetales* 16(1):5-24.
- Kauth PJ, Biber PD (2015) Moisture content, temperature, and relative humidity influence seed storage and subsequent survival and germination of *Vallisneria americana* seeds. *Aquatic Botany* 120: 297-303.



- Ke X, Li W (2006) Germination requeriment of *Vallisneria natans* seeds: implications for restoration in Chinese Lakes. *Hydrobiologia* 559: 357-362.
- Kujawshi J, Thompson N (2000) Propagation of redhead grass (*Potamogeton perfoliatus* L) Transplants for restoration projects. *Native plants Journal* 1(2): 124-127.
- Lau S, Slane D, Herud O, Kong J, Jürgens G (2012) Early embryogenesis in flowering plants: setting up the basic body pattern. *Annual review of plant biology* 63: 483-506.
- Les DH, Jacobs SW, Tippery NP, Chen L, Moody ML, Wilstermann-Hildebrand M (2008) Systematics of *Vallisneria* (Hydrocharitaceae). *Systematic Botany* 33(1): 49-65.
- Lot A, Novelo A, Ramirez-García P (1986) Listados florísticos de México V. Angiospermas acuáticas mexicanas 1. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología de la UNAM, México.
- Marion S R, Orth RJ (2010) Innovative Techniques for Large-scale Seagrass Restoration Using *Zostera marina* (eelgrass) Seeds. *Restoration Ecology* 18(4): 514–526.
- McSkimming C, Connell SD, Russell BD, Tanner JE (2016) Habitat restoration: early signs and extent of faunal recovery relative to seagrass recovery. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 151: 51-57.
- Moore KA, Jarvis JC (2007) Using seeds to propagate and restore *Vallisneria Americana* Michaux (Wild celery) in the Chesapeake Bay. SAV Technical Notes Collection (ERDC/TN SAV-07-3) Vicksburg, MS: U.S. Army Engineer Research and Development Center
- Mukul-López, H Gl., De-la-Peña, C., Galaz-Ávalos, R M., y Loyola-Vargas, V M. (2012) Evaluation of the Extracellular Proteome Profile During the Somatic Embryogenesis Process of *Coffea spp.* *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(1), 72-79. Recuperado en 03 de junio de 2016 de 2016.[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870249X2012000100012&lng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870249X2012000100012&lng=en)
- Novelo RA, Ramos L (2005) Vegetación acuática. Cap. 5: 11-144. En Bueno, J, Álvarez, F. Santiago, S. (Edits) Biodiversidad del Estado de Tabasco. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Uso y Conservación de la Biodiversidad. México DF. 386 pp.
- Novelo RA (2006) Plantas acuáticas de la Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla. Espacios naturales y desarrollo sustentable A. C. 260 pp.



- O'Donnell J, Fryirs KA, Leishman MR (2016) Seed banks as a source of vegetation regeneration to support the recovery of degraded rivers: A comparison of river reaches of varying condition. *Science of The Total Environment* 542: 591-602.
- Ogdahl ME, Steinman AD (2015) Factors influencing macrophyte growth and recovery following shoreline restoration activity. *Aquatic Botany* 120: 363-370.
- Orth Jr, Carruthers BJT, Dennison CW, Duarte MC, Fourqurean WJ, Heck LK Jr, et al. (2006) A Global Crisis for Seagrass Ecosystems. *BioScience* 56(12): 987-996.
- Orth RJ, Marion, S. R., Moore, K. A., y Wilcox, D. J. (2010) Eelgrass (*Zostera marina* L.) in the Chesapeake Bay region of mid-Atlantic coast of the USA: challenges in conservation and restoration. *Estuaries and Coasts* 33(1): 139-150.
- Pan B, Yuan J, Zhang X, Wang Z, Chen J, Lu J et al. (2016) A review of ecological restoration techniques in fluvial rivers. *International Journal of Sediment Research*
- Pagnussat GC, Alandete-Saez M, Bowman JL, Sundaresan V (2009) Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Science* 324(5935): 1684-1689.
- Poirrier MA, Burt-Utley K, Utley JF, Spalding EA (2010) Submersed Aquatic Vegetation of the Jean Lafitte National Historical Park and Preserve. *Southeastern Naturalist* 9(3): 477-486.
- RAMSAR (2000) Convención sobre los humedales. Notas informativas sobre los valores y las funciones de los humedales. <http://www.ramsar.org/valusintrs.htm>
- Roca G, Alcoverro T, Krause-Jensen D, Balsby TJ S, van Katwijk MM, Marbà N, Pérez M (2016) Response of seagrass indicators to shifts in environmental stressors: A global review and management synthesis. *Ecological Indicators* 63: 310-323.
- Ruiz-Carrera V, Sánchez AJ (2008) Desarrollo de un modelo de cultivo *in vitro* para *Vallisneria americana* Michx. *Universidad y Ciencia* 24(3): 205-218.
- Ruiz-Carrera V, Sánchez AJ (2012a) Estrategias experimentales y repoblación de angiospermas sumergidas en un humedal fluvial en la zona costera del sureste de México. En: Sánchez AJ, Chiappa-Carrara X, Pérez B (eds). *Recursos Acuáticos Costeros del Sureste Volumen II*. CONCYTEY. Mérida, México. 674 pp.
- Ruiz-Carrera V, Sánchez AJ (2012b) Estrategias de propagación en *Vallisneria americana*: experimentos *in vitro* en *Vallisneria americana*. Editorial Académica Española.



- Sánchez AJ, Barba E (2005) Biodiversidad de Tabasco. Cap. 1:1-16. En Bueno J, Álvarez F, Santiago S (Eds). Biodiversidad del Estado de Tabasco. Instituto de Biología, UNAM-CONABIO. México. 386 pp.
- Sánchez AJ, Salcedo MA, Florido R, Armata A, Rodríguez-Leal, Galindo A, Moguel E (2007) Pantanos de Centla, un humedal costero tropical En: de la Lanza G, García-Calderón JL (Eds.), Las Aguas Interiores de México. Conceptos y Casos. AGT Editor S.A. Ciudad de México. 398-422 pp.
- Sánchez AJ, Florido R, Salcedo MA, Ruiz-Carrera V, Montalvo-Urgel H, Raz-Guzmán A (2012) Macrofaunistic diversity in *Vallisneria americana* Michx. En: a tropical wetland, southern Gulf of Mexico: 1-26. En: Mahamane A (ed) Diversity of Ecosystems. InTech. Zagreb, Croacia. 484 pp.
- Schloesser DW, Manny BA (2007) Restoration of wildcelery, *Vallisneria americana* Michx., in the lower Detroit River of the Lake Huron-Lake Erie corridor. Journal of Great Lakes Research 33: 8-19.
- Subhashini P, Raja S, Thangaradjou T (2014) Establishment of cell suspension culture protocol for a seagrass (*Halodule pinifolia*): Growth kinetics and histomorphological characterization. Aquatic Botany 117: 33-40.
- Wang P, Zhang Q, Xu YS, Yu FH (2016) Effects of water level fluctuation on the growth of submerged macrophyte communities. Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants 223: 83-89.
- Zarranz M (2010) Conservación *ex situ* de *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. Propagación de semillas *in vitro*, y establecimiento de cultivos celulares. Tesis de doctorado. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. España.
- Zarranz ME, González-Henríquez N, García-Jiménez P, Robaina RR (2010). Restoration of *Cymodocea nodosa* seagrass meadows through seed propagation: germination *in vitro*, seedling culture and field transplants. Botanica Marina 53(2): 173-181.
- Zavattieri M, Frederico A, Lima M, Sabino R, Arnholdt-Schmitt B (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. Electronic Journal of Biotechnology, 13(1): 12-13 Revisado en agosto 22, 2014, de: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v13n14/1082z>



Zhongqiang L, Yu D, Manghui T (2005) Seed germination of three species of *Vallisneria* (Hydrocharitacea), and the effects of freshwater microalgae. *Hydrobiologia* 544:11-18.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

## Capítulo II.

Sensibilidad de *Vallisneria americana*  
(Michx) a fitorreguladores en la inducción  
embriogénica



## **SENSIBILIDAD DE *Vallisneria americana* (MICHX.) A FITOREGULADORES EN LA INDUCCIÓN EMBRIOGÉNICA**

### **INTRODUCCIÓN**

La producción de Es de la angiosperma sumergida *Vallisneria americana* representa una opción innovadora para su propagación e incrementa la posibilidad de suministrar germoplasma de manera sustentable para proyectos de rehabilitación de humedales. En Norte y Centro América, es una especie estenoica con reportes de declinación progresiva o pérdida por eutrofización y anoxia (Sánchez *et al.* 2007), ya que la perturbación antropogénica ha generalizado la magnitud del desequilibrio ambiental y la degradación de muchos ecosistemas acuáticos (O'Donnell *et al.* 2016). La dispersión de semillas es la estrategia de repoblación inmediata aplicada en los ecosistemas perturbados por la disminución de las poblaciones de *Zostera marina*, *Cymodosea nodosa*, *Posidonia sp.*, *Rupia sp.* y *V. americana* (Orth *et al.* 2000 y 2010, Marion y Orth 2010, Tanner y Parham 2010). Este método de repoblación presenta mayor correlación positiva con la variabilidad genética, menor esfuerzo de plantación e impacto que los métodos mecanizados que se han usado mediante el trasplante de organismos sanos (Tanner y Parham, 2010). Sin embargo, la sustracción masiva de semillas de poblaciones naturales, la baja tasa de germinación natural y su inevitable dependencia estacional han sido los factores que han limitado este método. Para cubrir la demanda de germoplasma de especies sumergidas se ha recurrido a los métodos propagación *in vitro* por ES. El método básico involucra el cultivo de microestructuras reproductivas o vegetativas en medios químicamente definidos, en heterotrofia y con inducción de la competencia embriogénica conducida por fitoreguladores (FR). El 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ha sido el FR más eficiente en macrófitas acuáticas (Álvarez 2007, Zarranz *et al.* 2010, Hernández 2012), sin embargo la adición de otros fitoreguladores como ácido-naftalenacético (ANA), belciladenilpurina (BAP) y Picloram (PIC), tienen la capacidad de regenerar plantas por esta vía (Zavattieri *et al.* 2010). También, la BAP ha inducido mejores respuestas en la formación de callos (Montero-Cortés *et al.* 2011, Gutiérrez-Mora *et al.* 2012). Por ejemplo, *Cocos nucifera* con 2,4-D: BAP en relación 0.65:1 expresada en mg L<sup>-1</sup> formó callo embriogénico en el 50% de germinados después de 150 días (Montero-Cortés *et al.* 2011). En especies de vegetación sumergida inducidas a procesos de regeneración, organogénesis o embriogénesis (Balestri y Bertini 2003, Zhongqiang *et al.* 2005, Ailstock y Shafer 2006, Álvarez 2007,



Hernández 2012, Ke y Li 2006, Marion y Orth 2010, Zarranz 2010 y Zarranz *et al.* 2010) los aspectos críticos del cultivo *in vitro* han sido la generación de explantes asépticos y su elevada sensibilidad a los FR (García-Jiménez *et al.* 2006. Zavattieri *et al.* 2010, Gutiérrez Mora *et al.* 2012).

En *Vallisneria americana*, la asepsia fue superada en heterotrofia y con 2,4-D con la mezcla de plantas juveniles y sus bases aisladas; y en etapas de proliferación embriogénica produjo masas proembriogénicas por vía directa en 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 3% de sacarosa. La finalidad de este estudio fue mejorar el cultivo embriogénico de *V. americana* como alternativa de propagación de germoplasma masivo a mediano plazo. La sensibilidad de germinados de *V. americana* y sus bases caulinares aisladas a los fitoreguladores 2,4-D, BAP y TDZ puede conducir a la selección de líneas celulares con mayor capacidad de diferenciación y dispersión embriogénica.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal y almacén.** *Vallisneria americana* Michx. (Hydrocharitaceae) forma parte de las poblaciones naturales de vegetación acuática sumergida de la laguna San Pedrito (17° 57' 53" y 18° 39' 03" N y 92° 06' 39" y 92° 47' 58" O), ubicada en el humedal Reserva de la Biosfera de Pantanos de Centla. Allí, se cosecharon los frutos maduros durante la temporada de inundación baja. El fruto fue trasladado en un recipiente de plástico con agua de la laguna. Los frutos se conservaron a 5° C, con recambio de agua estéril cada tres meses. Las semillas (3.3 mm x 1 mm, n=10) con mucílago se extrajeron de los frutos cortando su superficie con el bisturí, fueron lavadas con abundante agua de la llave, escurridas y refrigeradas (5° C) en agua purificada® (ISO 9000:2001) durante 15 d.

**Cultivo de semillas.** La desinfección de semillas se realizó en 10 % de solución de Cloralex® (1 g /50 ml) a 250 rpm por 10 min, y se enjuagaron tres veces con agua estéril. Alrededor de 50 mg de semillas asépticas fueron establecidas en 60 ml de agua dulce estéril (Eaton 2000) con 3% de sacarosa (p/v) y pH 7.5 ± 0.2. El recipiente de cultivo fue de vidrio (4 cm de diámetro y 7 cm de alto) cubierto con tapa magenta®. La esterilización se realizó en autoclave a 1.05 Kg cm<sup>-2</sup> y 121 °C durante 15 min. Una vez cultivados los explantes, los frascos se taparon con plástico estirable y autoadherible (Bolsipack®). Los germinados regeneraron en ambiente físico controlado a 30 °C (Thermo-Hygro® Control Company), luz tenue de 2 µmol de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Light Meter® Exttech Instruments) y para los experimentos se usó el fotoperiodo de 16 h.

**Cultivo de explantes vegetativos.** El medio de cultivo (Phytotechnology® Laboratories M519) de Murashige y Skoog (1962) fue utilizado con la mitad de la fuerza iónica (0.5 MS), más vitaminas, 3% de sacarosa, 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico y antes de agregar los FR, el pH fue ajustado a 5.8 ± 0.2.



Los germinados completos y las bases caulinares disectadas se colocaron por separado en la unidad de cultivo estéril preparada con 20 ml de medio de cultivo y estuvieron en agitación de 125 rpm durante todo el experimento. Se usaron procedimientos de esterilización y unidades de cultivo similares a las de semillas.

**Experimento.** En el experimento de inducción embriogénica de *Vallisneria americana* se analizó el efecto individual de los FR (2,4-D, BAP y TDZ) en base caulinar del germinado aislado (BGA) y del germinado completo (BGC). Los niveles de concentración de FR ( $\text{mg L}^{-1}$ ) fueron 1, y de 2,4-D y BAP, y  $0.6 \times 10^{-3}$  y  $0.6 \times 10^{-5}$  de TDZ. El control fue el MS sin FR. La asepsia y sensibilidad de los explantes a los FR fue calificada en escala porcentual. La asepsia del cultivo fue diagnosticada por la presencia o ausencia de microorganismos (bacterias, hongos, etc). Así mismo, a los 7, 14 y 21 días del inicio del cultivo se registraron las respuestas celulares características del proceso de embriogénesis somática (Filinova *et al.* 2000): callo embriogénico, masas proembriogénicas, embrión somático y células suspendidas.

El promedio porcentual de cultivo de todas las respuestas celulares y de diferenciación embriogénica se analizaron por su tendencia a disminución o incremento en el tiempo.

### RESULTADOS

Todos los explantes fueron sensibles frente a los FR, y también las del control. Las bases de rizoma mostraron elevada asepsia (Figura 1) y sensibilidad (Figura 2 y 3) en los cultivos *in vitro*. La sensibilidad de la base del rizoma al juego de FR fue incrementando en el tiempo con la manifestación de un gradiente de respuestas celulares inherentes a la formación de callo embriogénico (agregados celulares adheridos alrededor del frasco, callo café, callo crema y células suspendidas). El porcentaje de no sensibles fue bajo o inhibido por la contaminación.

Las respuestas registradas en los cultivos de los explantes BGA y BGC se muestran en la Figura 2 y 3. BGA registró 5 categorías de respuestas celulares que se observan en la Figura 2). La suspensión celular en 80 y 100% de los cultivos. El callo café se formó entre un 20 y 100% con 2,4-D en ambas concentraciones, BAP de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  y TDZ de  $0.6 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ .

En BGA la interacción del perfil lineal entre las respuestas de callo café y células suspendidas fue acoplado en los tratamientos de 2,4-D de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  y TDZ  $0.6 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 4). El callo presentó el porcentaje más elevado de cultivos a los 7 días y las células suspendidas fueron a los 14 días. Sin embargo se presentaron otras respuestas como se observa en la figura 2, con un patrón diferente



para BGC. Estas concentraciones presentaron mejores condiciones en la proliferación celular de origen embriogénico.

En BGC, el perfil fue similar entre BAP 2 mg L<sup>-1</sup>, TDZ 6x10<sup>-3</sup> mg L<sup>-1</sup>, TDZ 6x10<sup>-5</sup> mg L<sup>-1</sup> y MS, es decir primero formaron células suspendidas y posteriormente formaron callo café, pero con elevado porcentaje de células suspendidas a los 7 días.

### DISCUSIÓN

Los FR provocaron formación en los explantes. BGA a los 21 d los callos ( $p < 0.5$ ) a los 21d. El porcentaje de cultivos en células suspendidas fue similar entre TDZ 0.6x10<sup>-5</sup> mg L<sup>-1</sup>, BAP 2 mg L<sup>-1</sup> y 2,4-D 1 mg L<sup>-1</sup>, junto con el control excluido; TDZ 0.6x10<sup>-3</sup> mg L<sup>-1</sup> y 2,4-D 2 mg L<sup>-1</sup>. Se pudo determinar las líneas celulares, una en producción de células suspendidas y la otra en producción de callo embriogénico, principalmente de callo café, como mejor respuesta a la obtención de producción de embriones. Las diferencias significativas respecto a los explantes y en ambas.

La selección de FR y explantes son factores que determinan el éxito de la vía morfogénica por embriogénesis somática y en *Vallisneria americana* influyeron, la asepsia de los cultivos, la estructura del explante y su sensibilidad celular a los fitoreguladores. La garantía para iniciar el protocolo de cultivos celulares embriogénicos fue la elevada asepsia de los explantes en cultivo, debido a que la contaminación ha sido el factor crítico para iniciar cultivos *in vitro* en especies sumergidas (Zarranz 2010 y *et al.* 2010, Hernández 2012, Ruiz-Carrera y Sánchez 2012).

La sensibilidad celular embriogénica se potencializó en presencia de los FRs, ya que en ausencia de FRs el registro de sensibilidad celular a la inducción de callo embriogénico se manifestó y fue independiente a la condición estructural de la base caulinar del germinado. En muchas especies, la falla para desarrollar el Es en medio de cultivos libres de FRs ha indicado la esencialidad de bajas concentraciones de 2,4-D para el disparo del proceso de ES. En otros casos el desarrollo de los tipos de células embriogénicas y no embriogénicas de células pueden ser influenciadas por el estrés, pH y la concentración de 2,4-D.

En ausencia de FRs, el estímulo embriogénico fue atribuido a factores de estrés mecánico y osmótico (Jiménez 2005, George *et al.* 2008, Zavatieri *et al.* 2010, Fehér 2015). El primero se relacionó a la condición de cultivo agitado. El segundo factor, que ha sido menos citado, fue a la concentración salina del medio de cultivo o sinergia hormonal para propiciar la formación de masas proembriogénicas (Bernal-Flores *et al.* 2015). Probablemente el proceso embriogénico fue desencadenado por ser esencialmente una especie acuática limnética (Fehér 2015).



En la mayoría de los cultivos la formación de callo embriogénico y suspensiones celulares fue favorable el TDZ en concentración menor y el 2,4-D y BAP en concentración mayor, mostrando menor proporción y retraso las bases caulinares de germinados completos. Especialmente, se comprueba que el 2,4-D en concentración de 2 mg L<sup>-1</sup> es una concentración adecuada para la inducción de la embriogénesis somática de *Vallisneria americana*, conforme a Álvarez (2007). La inducción de callo embriogénico en un medio de cultivo suplementado en dosis de moderada a reducida de la auxina 2,4-D, se ha indicado en un alto número de plantas como las 25 especies mencionadas por Jiménez (2005) y otras más (Tripathy *et al.* 2013, Salam *et al.* 2015, Steinmacher *et al.* 2016).

El efecto que favoreció del TDZ la formación de callo embriogénico fue expresado en la base caulinar aislada del germinado más que en el explante complejo. Se ha citado que el efecto constante de TDZ interrumpe el metabolismo hormonal de las células proembrionarias siendo probable que el TDZ en mayor concentración haya afectado la calogénesis en *Vallisneria americana* por estrés tóxico (Kodja *et al.* 2015). Se ha generado conocimiento acerca de los procesos bioquímicos-moleculares involucrados en la morfogénesis inducida por esta fitohormona. Uno de ellos relacionó la formación de callo embriogénico con el estímulo del metabolismo endógeno de auxinas y ácido abscísico (ABA). En un estudio realizado en *Arabidopsis thaliana* sobre la interacción entre auxina y citocinina, se encontró que esto es reprimido por ciertos genes en la dirección de la iniciación de callo (Naik y Al-Khayri 2016). En correspondencia a la hipótesis planteada: la influencia de la complejidad del explante la combinación del 2,4-D con otros fitorreguladores, como el BAP y el TDZ, desencadenarán la embriogénesis somática en *V. americana* o propiciarán la proliferación de células embriogénicas como vía alternativa para la masificación de embriones, ambos mecanismos genéticos pudieron ser desfavorables en la embriogénesis somática de *V. americana* debido a la complejidad del explante (Freire 2009, Fehér 2015). Durante la iniciación de la ES las condiciones ambientales determinan la tasa de líneas de células embriogénicas que se forman y así mismo la cantidad de embriones somáticos (Salam *et al.* 2015, García-Mendiguren *et al.* 2016, Widuri *et al.* 2016).

Finalmente, el transcurso del tiempo entre la formación de callo embriogénico y suspensión celular definió la selección de tres líneas celulares embriogénica de cada fitorregulador. La declinación del callo embriogénico a los 14 días rindió cultivos de suspensión embriogénica de características similares a otros estudios (Morini *et al.* 2000). La asincronía entre en estos dos procesos fue más



claro en bases caulinares aisladas con mayor número de cultivos. Las células suspendidas representan productos más homogéneos que el callo embriogénico para el análisis de procesos, bioquímicos y moleculares que se requieren para interpretar el proceso de embriogénesis (Mukul-López *et al.* 2012); que el análisis proteómico revelaría diferencialmente las proteínas implicadas en la ES (Tchorbadjieva 2016).

En conclusión, la reducción anatómica de la base caulinar fue apropiada para iniciar la embriogénesis somática en *V. americana* y siendo sensible a un rango mayor de FRs; pero fue más sensible en 2,4-D, para calogénesis en suspensiones celulares. Estos resultados conducirán a la embriogénesis promisorio de alta frecuencia.

#### LITERATURA CITADA

- Ailstock S, Shafer D (2006) Applications and limitations of micropropagation for the production of underwater grasses ERDC/TN SAV-06-1.
- Álvarez GAL (2007). Inducción directa de embriones somáticos de *V. americana*. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.
- Eaton (2000) Standart methods for the examination of wáter and wastewater. 20<sup>th</sup> and American Public Health Association (APHA): 139 pp, Washinton, USA.
- Balestri E, Bertini S (2003) Growth and development of *Posidonia oceanica* seedlings treated with plant growth regulators: possible implications for meadow restoration. Aquatic Botany 76(4): 291-297.
- Bernal-Flores Á, Quero-Carrillo AR, Robledo-Paz A, Zavaleta-Mancera HA, Pérez-Rodríguez P (2015) Embriogénesis somática inducida con estrés osmótico en *Bouteloua curtipendula* (Michx) Torr., especie recalcitrante y apomíctica. Revista fitotecnia mexicana 38(4): 359-367.
- Fehér A (2015) Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms 1849(4): 385-402.
- Freire SM. (2009). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Biotecnología vegetal 3 (4):195-2009.
- García-Jiménez P, Navarr EP, Santana CH, Luque A, Robaina RR (2006) Anatomical and nutritional requirements for induction and sustained growth *in vitro* of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. Aquatic botany 84(1): 79-84.



- García-Mendiguren O, Montalbán IA, Goicoa T, Ugarte MD, Moncaleán P (2016) Environmental conditions at the initial stages of *Pinus radiata* somatic embryogenesis affect the production of somatic embryos. *Trees* 30(3): 949-958.
- George FE, Hall AM, De Klerk G (Eds.). (2008). Plant propagation by tissue culture. Cap. 9. Somatic embryogenesis. 3<sup>rd</sup> edition 335-354 pp. [http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4020-5005-3\\_9#page-1](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4020-5005-3_9#page-1)
- Gutiérrez-Mora A, González-Gutiérrez AG, Ascencio-Cabral A, Rodríguez-Garay B, Li-Wei L (2012) Plant somatic embryogenesis: some useful considerations. INTECH Open Access Publisher.
- Hernández PG (2012) Embriogénesis somática de *Typha domingensis*. Tesis de Maestría. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.
- Jiménez VM (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* 47: 91-110.
- Ke X, Li W (2006) Germination requirement of *Vallisneria natans* seeds: implications for restoration in Chinese Lakes. *Hydrobiologia* 559: 357-362.
- Kodja H, Noirot M, Khoiratty SS, Limbada, H, Verpoorte R, Palama TL (2015) Biochemical characterization of embryogenic calli of *Vanilla planifolia* in response to two years of thidiazuron treatment. *Plant Physiology and Biochemistry* 96: 337-344.
- Marion SR, Orth RJ (2010) Innovative Techniques for Large-scale Seagrass Restoration Using *Zostera marina* (eelgrass) Seeds. *Restoration Ecology* 18 (4): 514–526.
- Montero-Cortés, Mayra I., Chan-Rodríguez, José L., Cordova-Lara, Ivan, Oropeza-Salin, Carlos, y Sáenz-Carbonell, Luis. (2011). Addition of benzyladenine to coconut explant cultured *In vitro* improves the formation of somatic embryos and their germination. *Agrociencia* 45(6): 663-673. Recuperado en 02 de junio de 2016, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952011000600002&lng=es&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952011000600002&lng=es&tlng=en)
- Morini S, D'onofrio C, Bellocchi G, Fisichella M (2000) Effect of 2, 4-D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* cultured quince leaves. *Plant cell, tissue and organ culture* 63(1): 47-55.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Mukul-López HGI, De-la-Peña C, Galaz-Ávalos RM, y Loyola-Vargas VM (2012). Evaluation of the Extracellular Proteome Profile During the Somatic Embryogenesis Process of *Coffea spp.*



- Journal of the Mexican Chemical Society, 56(1), 72-79. Recuperado en 03 de junio de 2016, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870249X2012000100012&lng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870249X2012000100012&lng=en)
- Naik PM, Al-Khayri JM (2016) Somatic Embryogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Through Cell Suspension Culture. Protocols for *In Vitro* Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants, Second Edition 357-366.
- O'Donnell J, Fryirs KA, Leishman MR (2016) Seed banks as a source of vegetation regeneration to support the recovery of degraded rivers: A comparison of river reaches of varying condition. *Science of The Total Environment* 542: 591-602.
- Orth RJ, Harwell MC, Bailey EM, Bartholomew A, Jawad JT, Lombana AV, Woods HE (2000) A review of issues in seagrass seed dormancy and germination: implications for conservation and restoration. *Marine Ecology Progress Series* 200 277-288.
- Orth, RJ, Marion SR, Moore KA, Wilcox DJ (2010) Eelgrass (*Zostera marina* L.) in the Chesapeake Bay region of mid-Atlantic coast of the USA: challenges in conservation and restoration. *Estuaries and Coasts* 33(1): 139-150.
- Ruiz-Carrera V, Sánchez AJ (2012) Estrategias de propagación en *Vallisneria americana*: Experimentos *in vitro* en *Vallisneria americana*. Editorial Académica Española. ISBN 978-3-659 059711
- Salam AMA, Chowdhury K, El Bakry AA (2015) Effect of Sugar Types, Culture Age, Concentrations of 2, 4-D and Sucrose on Somatic Embryogenesis of *Cymbopogon schoenanthus* subsp. *proximus*. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 25(1): 51-62.
- Sánchez AJ, Salcedo MA, Florido R, Armeta A, Rodríguez-Leal, Galindo A, Moguel E (2007) Pantanos de Centla, un humedal costero tropical En: de la Lanza G, García-Calderón JL (Eds.), *Las Aguas Interiores de México. Conceptos y Casos*. AGT Editor S.A. Ciudad de México. 398-422 pp.
- Sánchez AJ, Florido R, Salcedo MA, Ruiz-Carrera V, Montalvo-Urgel H, Raz-Guzmán A (2012) Macrofaunistic diversity in *Vallisneria americana* Michx. En: A tropical wetland, southern Gulf of Mexico: 1-26. En: Mahamane A (Ed) *Diversity of Ecosystems*. InTech. Zagreb, Croacia. 484 pp.



- Steinmacher DA, Heringer AS, Jiménez VM, Quoirin MG, Guerra MP (2016) Somatic Embryogenesis in Peach-Palm (*Bactris gasipaes*) Using Different Explant Sources. *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants* 279-288.
- Tanner CE, Parham T (2010) Growing *Zostera marina* (eelgrass) from Seeds in Land-Based. Culture Systems for Use in Restoration Projects *Restoration Ecology* 18(4): 527–537.
- Tchorbadjieva MI (2016) Advances in proteomics of somatic embryogenesis. In *Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications* (pp. 67-90). Springer India.
- Tripathy S, Ranjan R, Lenka, D, Mohapatra B, Pal S (2013) Somatic embryogenesis from in vitro cultured internode explants in grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *International Research Journal of Plant Science* 4(1): 19-24.
- Widuri LI, Dewanti P, Sugiharto B (2016) A simple protocol for somatic embryogenesis induction of in vitro sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) by 2, 4-D and BAP. *BIOVALENTIA* 2(1)
- Zarranz M (2010) Conservación *ex situ* de *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. Propagación de semillas *in vitro*, y establecimiento de cultivos celulares. Tesis de doctorado. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria: España
- Zarranz ME, González-Henríquez N, García-Jiménez P, Robaina RR (2010). Restoration of *Cymodocea nodosa* seagrass meadows through seed propagation: germination *in vitro*, seedling culture and field transplants. *Botanica Marina* 53 (2): 173-181.
- Zavattieri M, Frederico A, Lima M, Sabino R, Arnholdt-Schmitt B (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology* 13 (1): 12-13 de: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v13n14/1082z>
- Zhongqiang L, Yu D, Manghui T (2005) Seed germination of three species of *Vallisneria* (Hydrocharitaceae), and the effects of freshwater microalgae. *Hydrobiologia* 544: 11-18.



### ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje total de asepsia en los cultivos de *V. americana*. Base de germinado aislado (BGA) y base de germinado completo (BGC). Categoría: rayado (contaminados) y blanco (asépticos).

Figura 2. Porcentaje total de la sensibilidad base del germinado aislado de *V. americana* a los FR (expresados en %). Categorías: ■ =células suspendidas; ■ =callo café; ■ = callo crema; ■ = film de células adheridos al recipiente; ■ =oleoso; ■ = contaminado.

Figura 3. Porcentaje total de la sensibilidad base del germinado complejo de *V. americana* a los FRs (expresados en %). Categorías: ■ =células suspendidas; ■ =callo café; ■ = callo crema; ■ = film de células adheridos al recipiente; ■ =oleoso; ■ = contaminado.

Figura 4. Tiempo de cultivo de *V. americana* con formación de callo café (ccf) y células suspendidas (cs). BGA=base caulinar de germinado aislado. BGC=base caulinar de germinado complejo. Barras = promedio  $\pm$  error estándar



Figura 1.

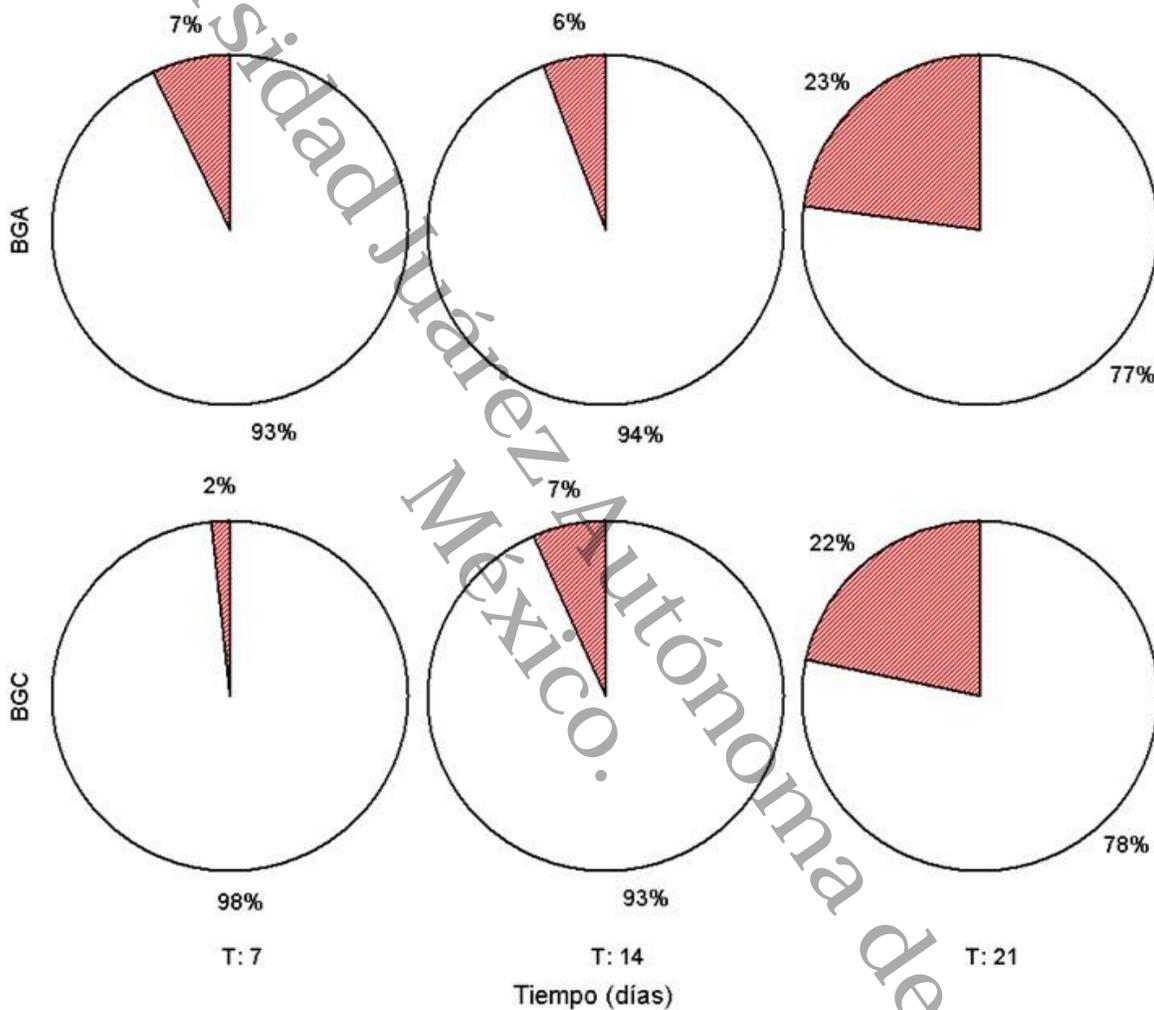


Figura 2.

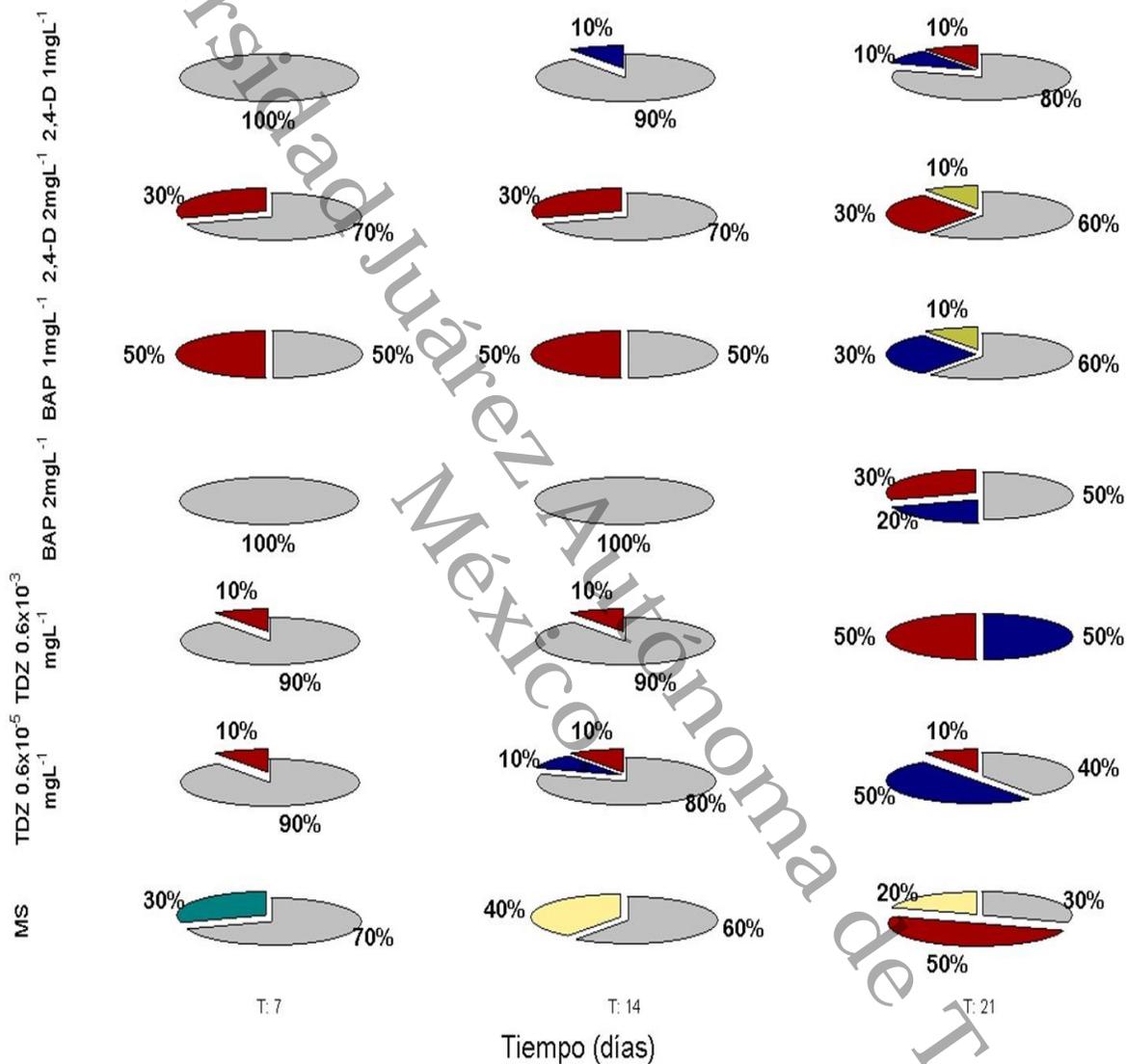
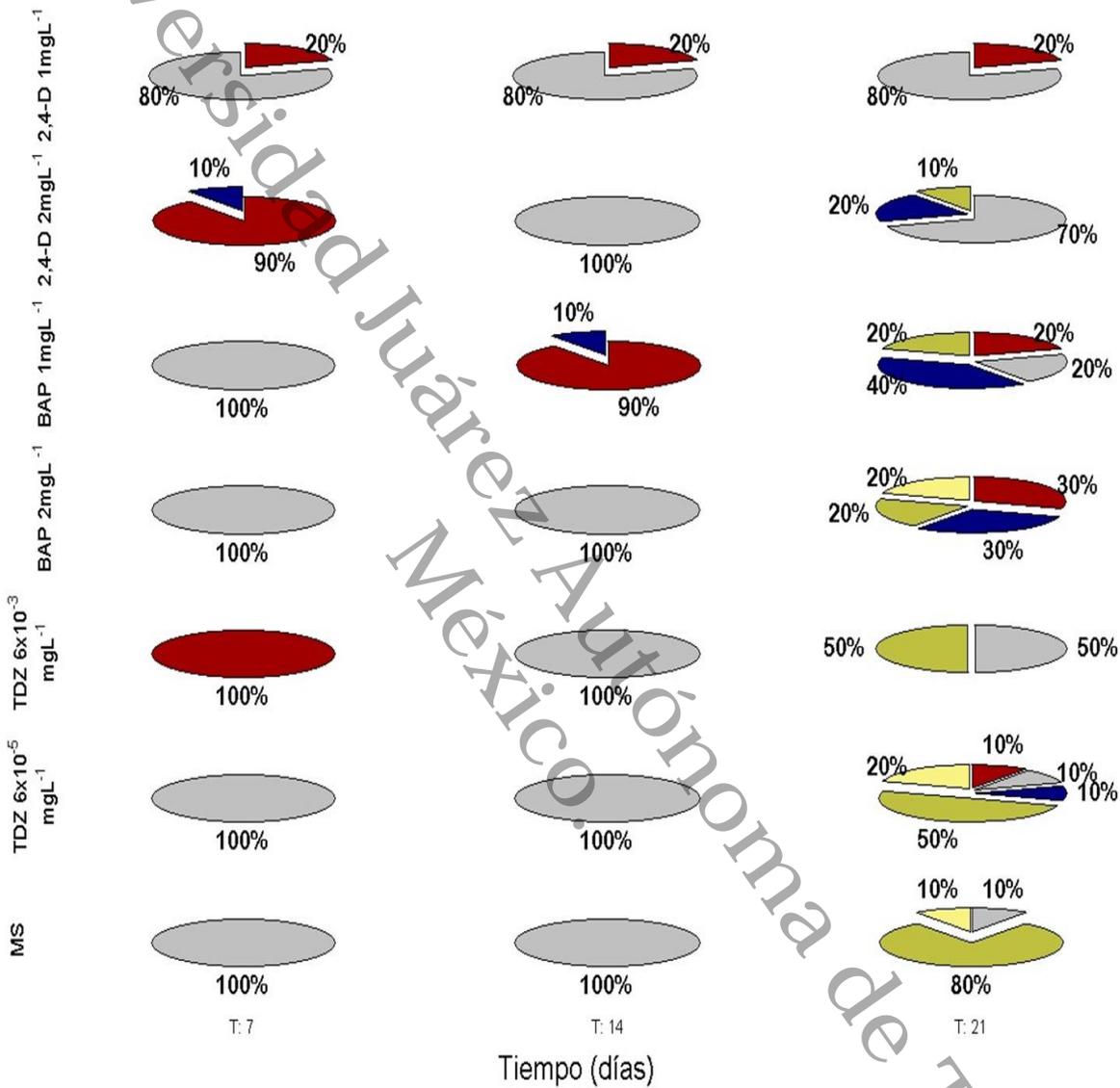
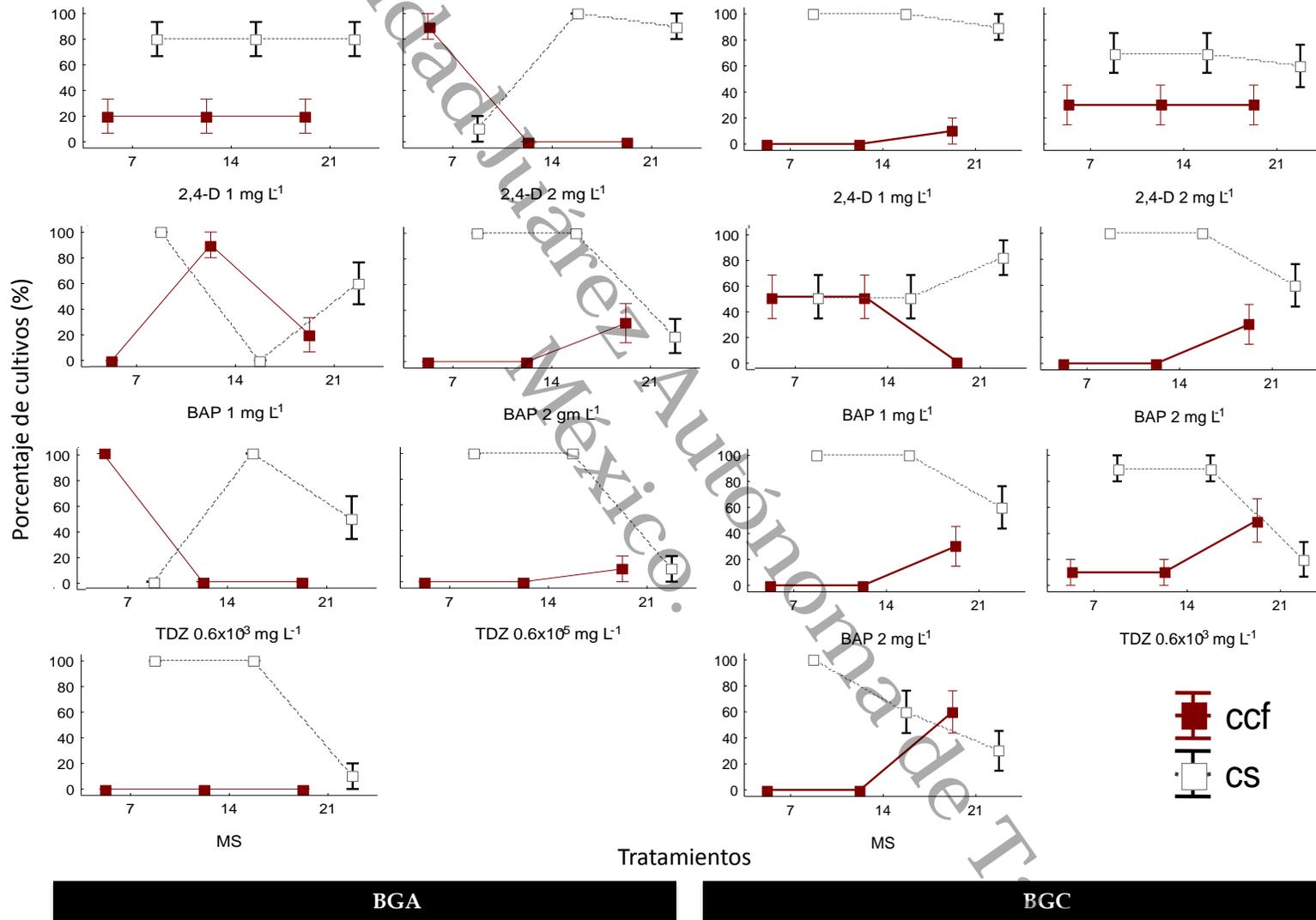


Figura 3.



Embriogénesis somática de *vallisneria americana*

Figura 4.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

### Capítulo III.

Proliferación de células embriogénicas  
en base caular aislada y compleja  
de *Vallisneria americana*



**PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS EMBRIOGÉNICAS EN BASE CAULINAR AISLADA Y COMPLEJA DE *Vallisneria americana***

**Embryogenic cell proliferation in caulinar basis isolated and complex of *Vallisneria Americana***

**INTRODUCCIÓN**

La vegetación de la angiosperma acuática *Vallisneria americana* Michx. (Hydrocharitaceae) es un componente ecológico funcional que sustenta servicios ambientales en ecosistemas de aguas frescas y salobres (Hobbs y Harris 2001). Entre sus funciones ecológicas se reconoce su capacidad para oxigenar el agua, filtrar xenobióticos, estabilizar los sedimentos, regular la temperatura ambiental, asimilar CO<sub>2</sub> y constituir el hábitat acuático que incrementa la abundancia y diversidad de la fauna acuática asociada y especies de importancia pesquera (Sánchez *et al.* 2012). La permanencia de *V. americana* en el ecosistema depende de la propagación clonal estolonífera para recolonizar; y la producción de semilla que preserva la variabilidad genética (Lloyd *et al.* 2012, Marsden *et al.* 2013). Sin embargo, sus poblaciones registran marcadas fluctuaciones espaciales y temporales en los humedales eutrofizados (Sánchez *et al.* 2007). Por consiguiente, los métodos de repoblación deberán ser efectivos para revertir su declinación o pérdida en los ecosistemas que presentan eutrofización.

Sin duda, para sustentar la operatividad de un proyecto de repoblación de humedales es primordial contar con el suministro de germoplasma sustentable (Ruiz y Sánchez 2012a, 2012b). Sin embargo, la sustracción de semillas y plantas del ecosistema y las plantas reproducidas en vivero han presentado limitaciones de índole ecológica y tecnológica (Balestri y Bertini 2003, Zhongqiang *et al.* 2005, Ailstock y Shafer 2006, Tanner y Parham 2010, Lloyd *et al.* 2012). La alternativa de la propagación *in vitro* por embriogénesis somática es una biotecnología inexplorada para este fin (Iriundo 2001, Marion y Orth 2010). Las técnicas de propagación *in vitro* por organogénesis y embriogénesis somática, así como la producción de suspensiones celulares han sido descritas en especies sumergidas para diferentes aplicaciones biotecnológicas (Subhashini *et al.* 2014) y ha favorecido estudios básicos sobre biología reproductiva, propagación masiva y sanidad de germoplasma (Blackhall *et al.* 1999, Krikorian y Simola 1999). En específico, el proceso embriogénico ha iniciado sobre el explante y a través de suspensiones celulares siendo la vía de proliferación celular el sistema de más alta eficiencia (Malinowski y Filipecki 2002, Radice 2004,



Freire 2009, Subhashini 2014, Von Arnold 2016). La inducción de embriones somáticos en los germinados de las especies acuáticas *Oryza sativa*, *Oryza australiensis* fue favorecida en 2,4-D y oscuridad (Blackhall *et al.* 1999). En *Cymodosea nodosa* regeneraron *in vitro* con  $10^{-6}$  M de Kinetina (KIN) y Tidiazuron (TDZ) el 5 % de explantes apicales cultivados, excepto el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), bencilaminopurina (BAP) y Ácido Giberélico (AG) en la misma dosis (García-Jiménez *et al.* 2006). La monocotiledónea *Anthurium andraeanum* produjo 84 % de embriones en etapa coleoptilar en explantes de callo 10 mM de BAP (Del Rivero *et al.* 2008). Así mismo el estrés mecánico, osmótico por elevada concentración de sales, tóxico por metales pesados, así como la dosis de fitoreguladores (auxinas, citocininas, ácido abscísico, AG, TDZ) o su balance han disparado el proceso embriogénico (Guo *et al.* 2011, Gutiérrez-Mora 2012 *et al.*). El proceso de embriogénesis somática incluye la inducción, multiplicación y expresión de los embriones resultantes (Freire 2009, Zavateri 2010, Gutiérrez-Mora *et al.* 2012, Mukul *et al.* 2012, Fehér 2015). En esta investigación los experimentos se establecieron con fitoreguladores en la etapa de inducción para evaluar la hipótesis que los explantes complejos de *V. americana* favorecen la diferenciación de masas proembriónicas a embriones a través de un sistema de embriogénesis somática de alta frecuencia.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de cultivos asépticos. La asepsia de semillas se realizó en 10 % de solución de Cloralex® (1 g / 50 mL) a 250 rpm por 10 min, y se enjuagaron tres veces con agua estéril. Alrededor de 50 mg de semillas asépticas fueron establecidas en 60 mL de agua dulce estéril (APHA 2000) con 3 % de sacarosa (p/v) y pH  $7.5 \pm 0.2$  usando recipiente de vidrio (4 cm diámetro y 7 cm alto) cubierto con tapa magenta®. La esterilización se realizó en autoclave a  $1.05 \text{ Kg cm}^{-2}$  y  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 15 min. Los cultivos se taparon con plástico estirable y autoadherible (Bolsipack®) y las germinados regeneraron en ambiente físico controlado a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (Thermo-Hygro® Control Company), luz tenue de  $2 \text{ } \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y fotoperiodo de 16 horas luz/oscuridad (Light Meter® Extech Instruments).

Los germinados de 30 días fueron tres veces transferidos cada mes a medio fresco en condición de luz de  $100 \text{ } \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Cuando el rizoma estolónífero mostró tres rametos (60 días) fue utilizado en el experimento. En el último mes se usó otro lote de germinados para el mismo fin. En ambos casos, el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) más vitaminas (Phytotechnology Laboratories M519) fue preparado con la mitad de la fuerza iónica (0.5 MS), 3% de sacarosa y 0.1% de ácido ascórbico. El medio de cultivo fue suplementado con los fitoreguladores 2,4-D (Sigma®



7299), BAP (Sigma® 7199) y TDZ (Sigma® 7293), y luego el pH se ajustó a  $5.8 \pm 0.2$ . Las condiciones de esterilización y ambientales fueron similares respecto a la germinación, excepto que en la unidad de cultivo se usaron 25 mL de medio nutritivo. Las bases caulinares fueron disectadas con el bisturí.

**Experimento de Inducción embriogénica.** En la etapa de inducción embriogénica se analizó el efecto de la interacción de 2,4-D/BAP ( $2:1 \text{ mg L}^{-1}$ ) y 2,4-D/TDZ ( $1:0.6 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ ) y la misma concentración individual de cada fitoregulador sobre cuatro explantes, que fueron de base caulinar aislada (BGA) y en el germinado completo (BGC) y de base aislada del rameto (BAR) y en el rameto completo (BCR). El control fue MS sin fitoregulador de BGA y BGC (MS1) y BRA y BRC (MS2). Cada tratamiento presentó cinco réplicas y dos explantes. Los cultivos embriogénicos fueron transferidos a medio fresco con fitoregulador en un intervalo de 14 días. El porcentaje de cultivos con las respuestas embriogénicas de formación de indirecta de callo, masas proembriogénicas y embriones, fue registrado a 7 y 14 días, sin destrucción de los cultivos. En el estereomicroscopio Olympus a 10X se confirmó la morfogénesis del callo embriogénico, y para las masas proembriogénicas se usó el Carl Zeiss modelo Axiostar Plus en 5.6X, equipado con cámara digitalizadora modelo Axiocam modelo MRC5. La concentración de células fue determinada en el espectrofotómetro Genesys 2 midiendo la absorbancia a 600 nm.

**Análisis estadístico.** A través del análisis de varianza paramétrico se analizaron los efectos de primer orden de las variables dependientes categóricas múltiples para el explante de germinados, fitoreguladores y tiempo de cultivo. En las variables callo embriogénico y embrión somático del factor explante de rametos la varianza y la de concentración celular mostró heterocedasticidad por lo que se usó el análisis de Kruskal Wallis de comparación de medianas. En todos los casos el nivel de confianza fue establecido a  $p < 0.05$ . El análisis estadístico fue desarrollado usando el programa Statistica V8 (Stat Soft Inc.).

## RESULTADOS

**Morfologías celulares embriogénicas.** Los callos embriogénicos fueron café, proliferaron y se diferenciaron en masas proembriogénicas, formaron embriones somáticos tempranos y además produjeron suspensiones celulares (Figura 4). El callo embriogénico fue de estructura compacta y en todos los explantes, se observó suspendido en el medio de cultivo. Las masas proembriogénicas fueron estructuras de color crema, muy pequeñas y alargadas, de talla  $2\ 211 \mu\text{m}$  y  $1\ 378 \mu\text{m}$  a  $5.6 \times$  (Figura 1). El embrión somático se identificó por su estructura globular de coloración blanquecina



transparente. La suspensión fue granular de coloración café; mientras que la fina fue blanca y unicelular y sus características se muestran en la Figura. 1.

**Inducción embriogénica.** En los cultivos de *V. americana*, la suspensión celular granular y fina se registró en el 100 % de los cultivos. En el proceso embriogénico fue menos eficiente la base caulinar de rameto en forma compleja (Figura 2). Mientras que las bases aisladas o completas de germinados sobresalieron sobre las de rametos, y mostraron similitud en la proporción de cultivos con callo embriogénico, masas proembriogénicas y embrión somático ( $p > 0.05$ ). En estas tres respuestas, los fitoreguladores individuales fueron invariablemente más efectivos que las combinaciones de auxina y citocinina quienes formaron un subgrupo estadístico con los controles ( $p < 0.05$ ). La proporción de cultivos embriogénicos fue similar en el tiempo ( $p < 0.05$ ).

**Células suspendidas.** La concentración celular fue similar entre bases caulinares de germinados aisladas y complejas ( $p < 0.05$ ), y su promedio fue 1.7 veces mayor comparado con la contraparte de rametos ( $p < 0.05$ ). Entre los fitoreguladores evaluados registraron mejores dispersiones celulares el 2,4-D y TDZ en forma individual ( $p < 0.05$ ), sin embargo el efecto del 2,4-D fue sensiblemente superior a TDZ ( $p < 0.05$ ). Entre BAP y el control MS y entre las combinaciones de fitoreguladores la diferencia en concentración celular fue menor ( $p < 0.05$ ).

### DISCUSIÓN

El protocolo de embriogénesis somática de *Vallisneria americana* fue adecuado al conseguir la estimulación de agregados de callo embriogénico y el desarrollo de masas proembriogénicas (tipo I) y embriones somáticos tempranos, no así de embriones somáticos maduros (Businge *et al.* 2012). La estimulación embriogénica en los explantes cultivados se suscitó sobre la base caulinar, pero fueron dos fitoreguladores individuales más efectivos que el balance de auxina y citocininas, y propiciaron mayor proliferación de células suspendidas.

El registro de callo embriogénico es aproximado comparado al obtenido en la especie acuática más investigada, *Oryza australiensis*, ya que alrededor del 90% de las bases caulinares produjeron callo que fueron liberados en pequeños agregados de células en el medio líquido (Blackhall *et al.* 1999). Los agregados embriogénicos forman masas proembriogénicas, y en base a su morfología y patrón de desarrollo se han clasificado en los tipos I, II y III de acuerdo a Filonova *et al.* (2000). Sin embargo, los cuatro explantes mostraron capacidades diferentes en las respuestas embriogénicas y en el nivel de la frecuencia de proliferación celular. Las bases aisladas de plantas juveniles que en plantas con rametos completo como explante en la combinación 2,4-D/TDZ. La



densidad celular incrementó en las bases que conduce a sistemas de producción de alta frecuencia en una gran variedad de especies de plantas (Gutiérrez-Mora *et al.* 2012). Bajas concentraciones de BAP y mayor número de transferencias en los cultivos mejoraron el establecimiento y multiplicación de embriones somáticos en los cultivos en suspensión de la monocotiledónea palma (*Phoenix dactylifera*) por el obscurecimiento oxidativo asociado con altos niveles de fenoles y actividades de peroxidasas (Abohatem *et al.* 2011). En cultivos embriogénicos de abeto rojo proliferan las masas proembriogénicas en presencia de auxina y citocinina (Businge *et al.* 2012). Sorprendentemente, el callo embriogénico se formó en los cultivos de bases de germinados completos y disectadas en ausencia de fitoregulador y aunque fue menos abundante respecto al efecto individual y combinado en todos los explantes. (George *et al.* 2008), las fitohormonas endógenas juegan un papel de regulación, muy importante en el desencadenamiento de señales de iniciación del proceso de embriogénesis somática (Jiménez 2001). El estudio metabólico en diferentes líneas embriogénicas de *Picea abies* reveló que la auxina endógena y la señalización de azúcar afectan el desarrollo del embrión somático en etapa inicial; además destacaron la importancia de una respuesta de estrés temporal y la presencia de metabolitos estimulantes durante las etapa final del desarrollo embrionario (Freire 2009, Zavateri 2010, Businge *et al.* 2012). Lo anterior se observó en los cultivos de *V americana* con el estímulo del TDZ. El modo de acción del TDZ cumple con funciones de metabolito de estrés y respuestas de regulación de proteínas, aunque se encuentre categorizado como citocinina (Guo *et al.* 2011).

La formación y evolución del callo embriogénico a otros desarrollos morfológicos en los explantes más maduros se ha explicado con base a moléculas activas producidas por síntesis o degradación de pared celular que actúan como señales en la regulación de la embriogénesis. La molécula señal identificada pertenece a oligosacáridos de las proteínas arabinogalactanas hidrolizados por acción de una quitinasa durante la estimulación de la embriogénesis (Egertsdotter y Arnold 1998, Van Hengel *et al.* 2001, Malinowski y Filipecki 2002). También el estrés mecánico por la condición de agitación en los cultivos pudo influir en los cultivos el desencadenamiento de un patrón genético por factores diversos intrínsecos del complejo de la plántula al diferenciarse la estructura vegetal como el potencial embriogénico, sumado con la fuerza iónica, el balance de las sustancias inorgánicas, adición de antioxidante, la expresión de los genes participantes en el proceso de inducción de la embriogénesis somática, la transcripción de factores (Radice 2004, Jiménez 2005, Von Arnold 2008, Freire 2009, Zavateri *et al.* 2010, Fehér 2015). En este estudio, el estrés en la embriogénesis fue



inhibitorio en la base de germinados y de rametos aislada, así mismo en una de las combinaciones en base completa de rametos y su control.

### CONCLUSIÓN

La formación de masas proembriogénicas (tipo I) de *V. americana* guía hacia futuros experimentos enfocados a la conclusión del protocolo de embriogénesis somática; ya que representa la tecnología de repoblación masiva a mediano plazo.

### LITERATURA CITADA

- Abohatem M, Zouine J, Hadrami El (2011) Low concentrations of BAP and high rate of subcultures improve the establishment and multiplication of somatic embryos in date palm suspension cultures by limiting oxidative browning associated with high levels of total phenols and peroxidase activities. *Scientia Horticulturae* 130(1): 344-348.
- Ailstock S, Shafer D (2006) Applications and limitations of micropropagation for the production of underwater grasses (No. ERDC-TN-SAV-06-1). Engineer Research and Development Center Vicksburg MS.
- APHA (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater. 20<sup>th</sup> Ed. APHA, Washinton, DC.
- Balestri E, Bertini S (2003) Growth and development of *Posidonia oceanica* seedlings treated with plant growth regulators: possible implications for meadow restoration. *Aquatic Botany* 76 (4): 291–297.
- Blackhall WN, Jotham JP, Power JB, Lowe KC, Cocking EC, Davey MR (1999) Callus initiation, maintenance, and shoot induction in rice. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 111: Plant Cell Culture Protocols. Humana Press. 421 pp.
- Businge E, Brackmann K, Moritz T, Egertsdotter U (2012) Metabolite profiling reveals clear metabolic changes during somatic embryo development of Norway spruce (*Picea abies*). *Tree Physiology* 32(2): 232-244.
- Del Rivero BN, Peñalver D A, Rodríguez R B, Chiu W C, López R C, Ferry F J, et al. (2008) Embriogénesis somática en ("*Anthurium andraeanum*" Lind.) variedad "LAMBADA". *Ra Ximhai: Revista Científica de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sostenible* 4(1): 135-150.
- Egertsdotter U. Arnold SV (1998) Importance of ara-binogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiologia Plantarum* 93: 334–345.



- Filonova LH, Bozhkov PV, Von Arnold S (2000) Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany* 51(343): 249-264.
- Freire SM (2009) Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología vegetal* 3(4):195-209.
- Fehér A (2015) Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1849(4): 385-402.
- George FE, Hall AM, De Klerk G (Eds.). (2008) Plant propagation by tissue culture. Cap. 9. Somatic embryogenesis. 3<sup>rd</sup> edition 335-354 pp. [http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4020-5005-3\\_9#page-1](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4020-5005-3_9#page-1) . Fecha de consulta 06 junio de 2016.
- Gutiérrez-Mora A, González-Gutiérrez AG, Ascencio-Cabral A, Rodríguez-Garay B, Li-Wei L (2012) Plant somatic embryogenesis: some useful considerations. In: Sato KI. Rijeka (ed) *Embryogenesis*. InTech 229-241.
- Guo B, Abbasi BA, Zeb A, Xu L, Wei YH (2011) Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology* 10 (45): 8984-9000.
- Hobbs RH, Harris JA (2001) Restoration ecology: Repairing the earth's ecosystems in the new millennium. *Restoration Ecology* 9: 239-246.
- Iriondo JM (2001) Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Investigación Agraria. Producción y Protecciones Vegetales* 16(1):5-24.
- Jiménez VM (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13(2): 196-223.
- Jiménez VM (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* 47: 91-110.
- Krikorian AD, Simola LK (1999) Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1893-1973). *Physiology Plantarum* 105: 347 –354.
- Lloyd MW, Burnett JRK, Engelhardt KA, Neel MC (2012) Does genetic diversity of restored sites differ from natural sites? A comparison of *Vallisneria americana* (Hydrocharitaceae) populations within the Chesapeake Bay. *Conservation Genetics* 13(3): 753-765.
- Malinowski R y Filipecki M (2002) The Role of Cell Wall in Plant Embryogenesis. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7(4): 1137-1152.



- Marsden BW, Engelhardt KA, Neel MC (2013) Genetic rescue versus outbreeding depression in *Vallisneria americana*: Implications for mixing seed sources for restoration. *Biological Conservation* 167: 203-214.
- Marion SR, Orth RJ (2010) Innovative Techniques for Large-scale Seagrass Restoration Using *Zostera marina* (eelgrass) Seeds. *Restoration Ecology* 18 (4): 514–526.
- Mukul-López HGI, De-la-Peña C, Galaz-Ávalos RM, Loyola-Vargas VM (2012) Evaluation of the extracellular proteome profile during the somatic embryogenesis process of *Coffea spp.* *Journal of the Mexican Chemical Society* 56(1): 72-79.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Radice S (2004) Morfogénesis *in vitro*. Parte II Herramientas Básicas de la Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. *Biotecnología y Mejora Vegetal*. (Ed): INTA, Buenos Aires, Argentina, 27-33.
- Ruiz-Carrera V, Sánchez AJ (2008) Development of a model for *in vitro* culture of *Vallisneria americana* Michx. *Universidad y Ciencia* 24(3): 205-218.
- Ruiz-Carrera V, Sánchez AJ (2012a) Estrategias experimentales y repoblación de angiospermas sumergidas en un humedal fluvial en la zona costera del sureste de México. En: Sánchez AJ, Chiappa-Carrara X, Pérez B (eds). *Recursos Acuáticos Costeros del Sureste Volumen II*. CONCYTEY. Mérida, México. 674 pp.
- Ruiz-Carrera V, Sánchez AJ (2012b) Estrategias de propagación en *Vallisneria americana*: experimentos *in vitro* en *Vallisneria americana*. Editorial Académica Española.
- Sánchez AJ, Barba E (2005) Biodiversidad de Tabasco. Cap 1:1-16. En Bueno J, Álvarez F, Santiago S (Eds). *Biodiversidad del Estado de Tabasco*. Instituto de Biología, UNAM-CONABIO. México. 386 pp.
- Sánchez AJ, Salcedo MA, Florido R, Armata A, Rodríguez-Leal, Galindo A, Moguel E (2007) Pantanos de Centla, un humedal costero tropical. En: de la Lanza G, García-Calderón JL (Eds.), *Las Aguas Interiores de México. Conceptos y Casos*. AGT Editor S.A. Ciudad de México. 398-422 pp.
- Sánchez AJ, Florido R, Salcedo MA, Ruiz-Carrera V, Montalvo-Urgel H, Raz-Guzmán A (2012) Macrofaunistic diversity in *Vallisneria americana* Michx. in a tropical wetland, southern Gulf of Mexico: 1-26. In: Mahamane A (ed) *Diversity of Ecosystems*. InTech. Zagreb, Croatia. 484 pp.



- Subhashini P, Raja S, Thangaradjou T (2014) Establishment of cell suspension culture protocol for a seagrass (*Halodule pinifolia*): Growth kinetics and histomorphological characterization. *Aquatic Botany* 117: 33-40
- Tanner CE, Parham T (2010) Growing *Zostera marina* (eelgrass) from seeds in land-based. *Culture Systems for Use in Restoration Projects Restoration Ecology* 18(4): 527–537.
- Van Hengel AJ, Tadesse Z, Immerzeel P, Schols H, Van Kammen, AB, de Vries SC (2001) N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiology* 125(4): 1880-1890.
- Von Arnold S, Larsson E, Moschou PN, Zhu T, Uddenberg, D, Bozhkov PV (2016) Norway spruce as a model for studying regulation of somatic embryo development in conifers. *Vegetative Propagation of Forest Trees. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul, Korea*, 351-372.
- Zavattieri MA (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology* 13(1): 12-13.
- Zhongqiang L, Yu D, Manghui T (2005) Seed germination of three species of *Vallisneria* (Hydrocharitacea), and the effects of freshwater microalgae. *Hydrobiologia* 544: 11-18.



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Establecimiento y desarrollo de la embriogénesis somática de *Vallisneria americana*: a) germinados *in vitro* b) rametos *in vitro* c) base de germinado aislada, d) callogénesis masiva a 14 días en  $2 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D, e) embrión somático, f) biometría de la masas proembriogénicas (escala 1:200  $\mu\text{m}$ ).

Figura 2. Respuestas de inducción embriogénica producidas en las bases caulinares de *Vallisneria americana* con fitoreguladores. BGA (base de germinado aislada), BGC (base de germinado completa), BRA (base de rameto aislada), BRC (base de rameto completa). Literales diferentes indican diferencias significativas a  $p < 0.05$ . Promedio  $\pm$  error estándar.

Figura 3. Comparación de efectos embriogénicos de *Vallisneria americana* inducidos con fitoreguladores individuales y combinados sobre las bases caulinares. BGA (base de germinado aislada), BGC (base de germinado completa), BRA (base de rameto aislada), BRC (base de rameto completa). Literales diferentes indican diferencias significativas a  $p < 0.05$ . Promedio  $\pm$  error estándar.

Figura 4. Concentración celular en bases caulinares de *Vallisneria americana*. BGA (base de germinado aislada), BGC (base de germinado completa), BRA (base de rameto aislada), BRC (base de rameto completa). Literales diferentes indican diferencias significativas a  $p < 0.05$ . Promedio  $\pm$  error estándar.



Figura 1

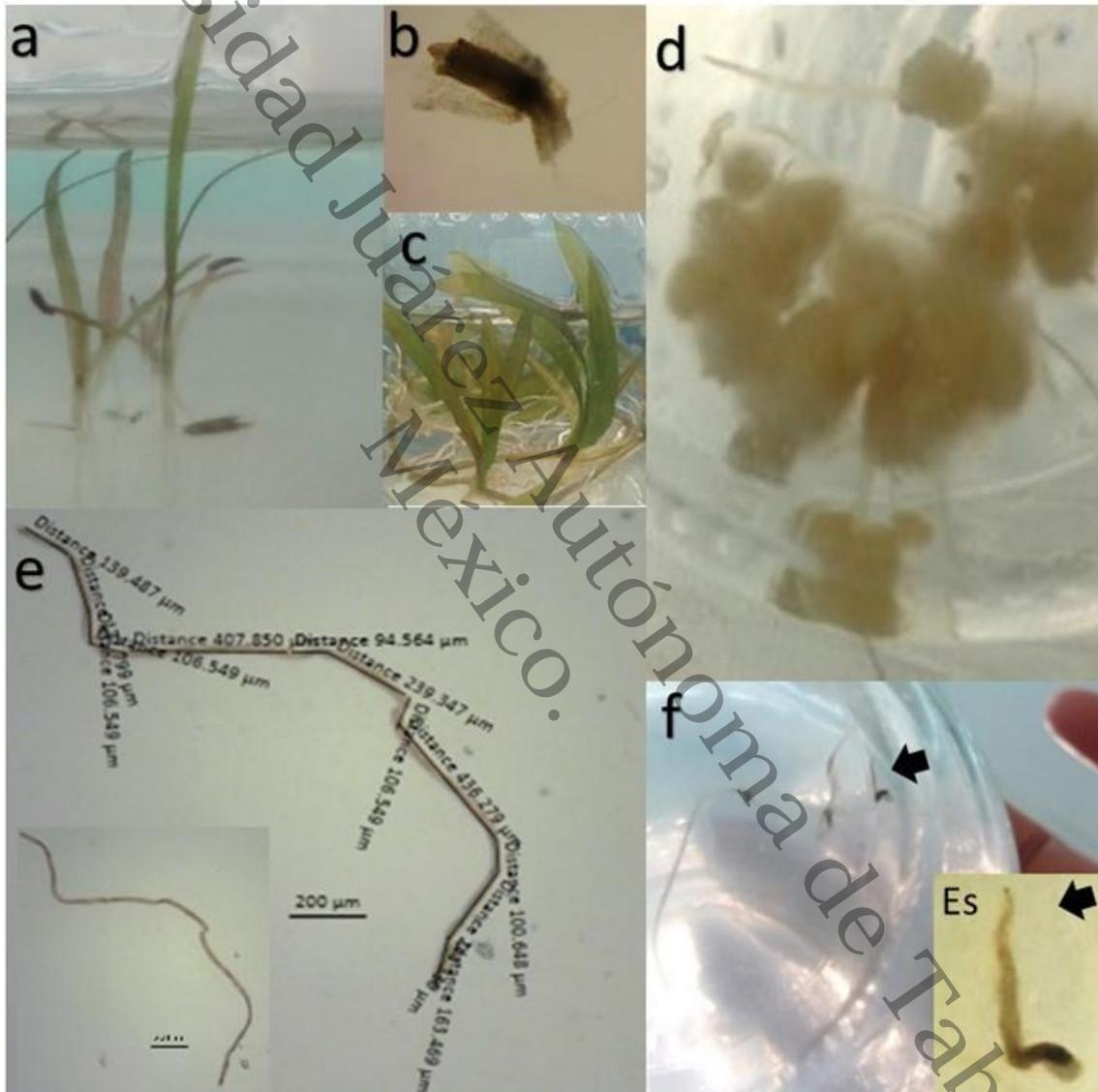


Figura 2

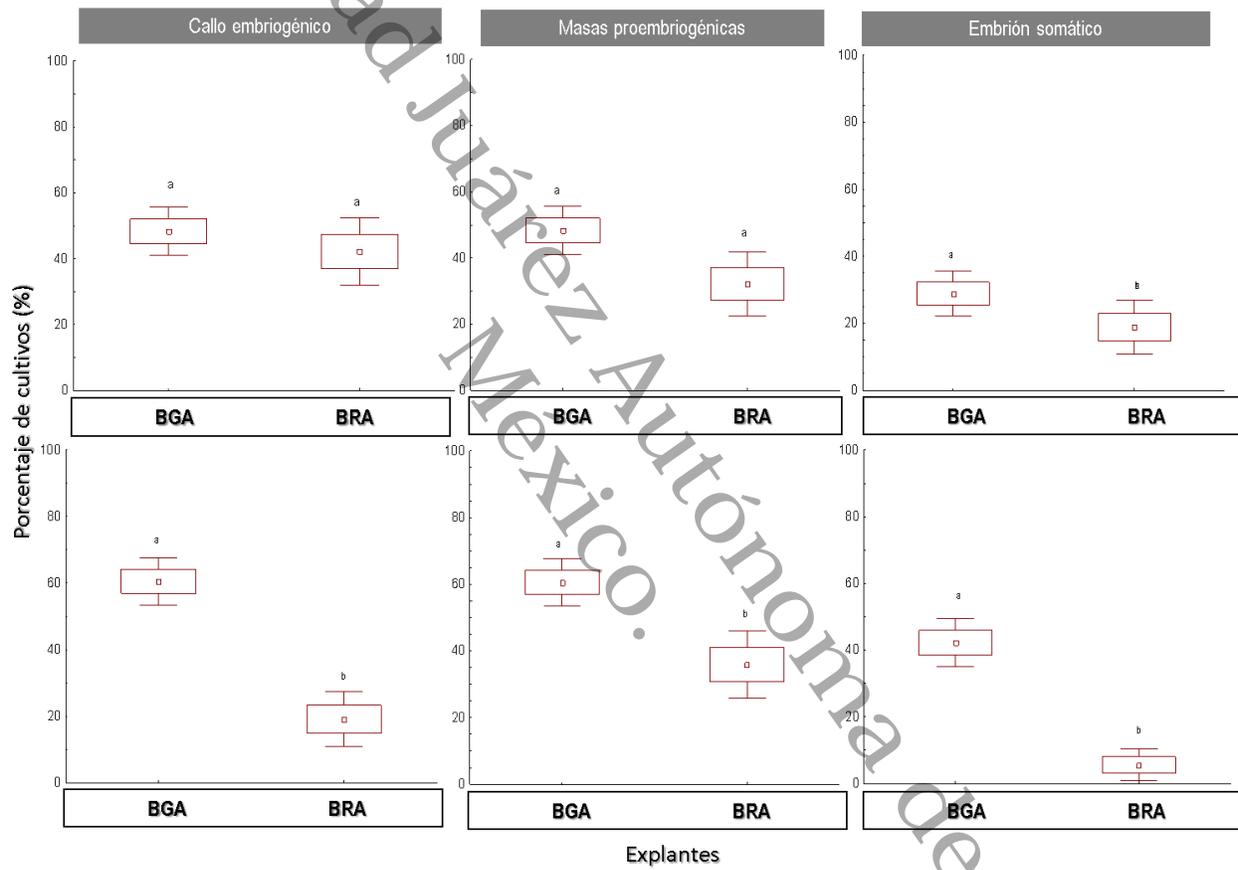


Figura 3

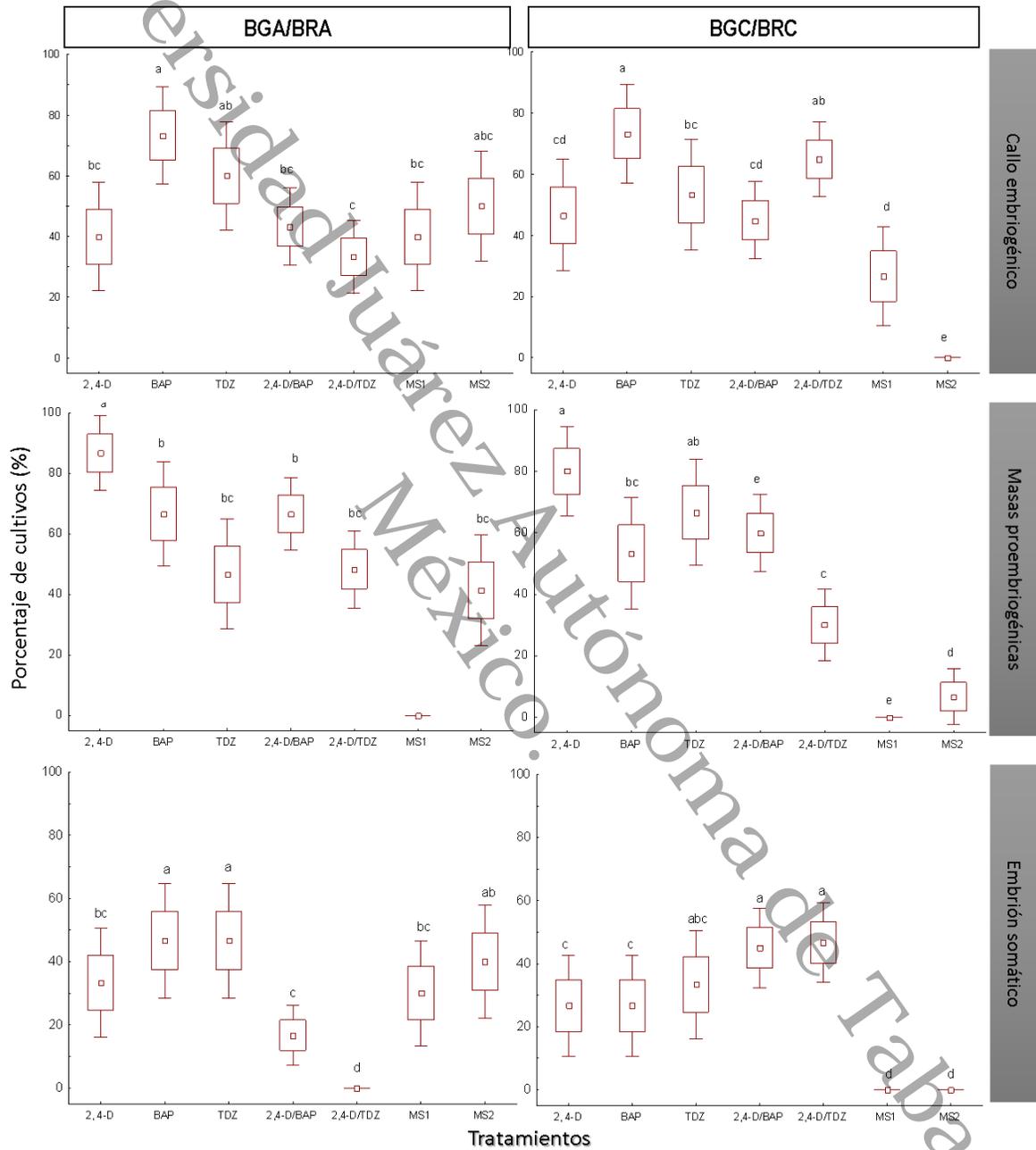


Figura 4

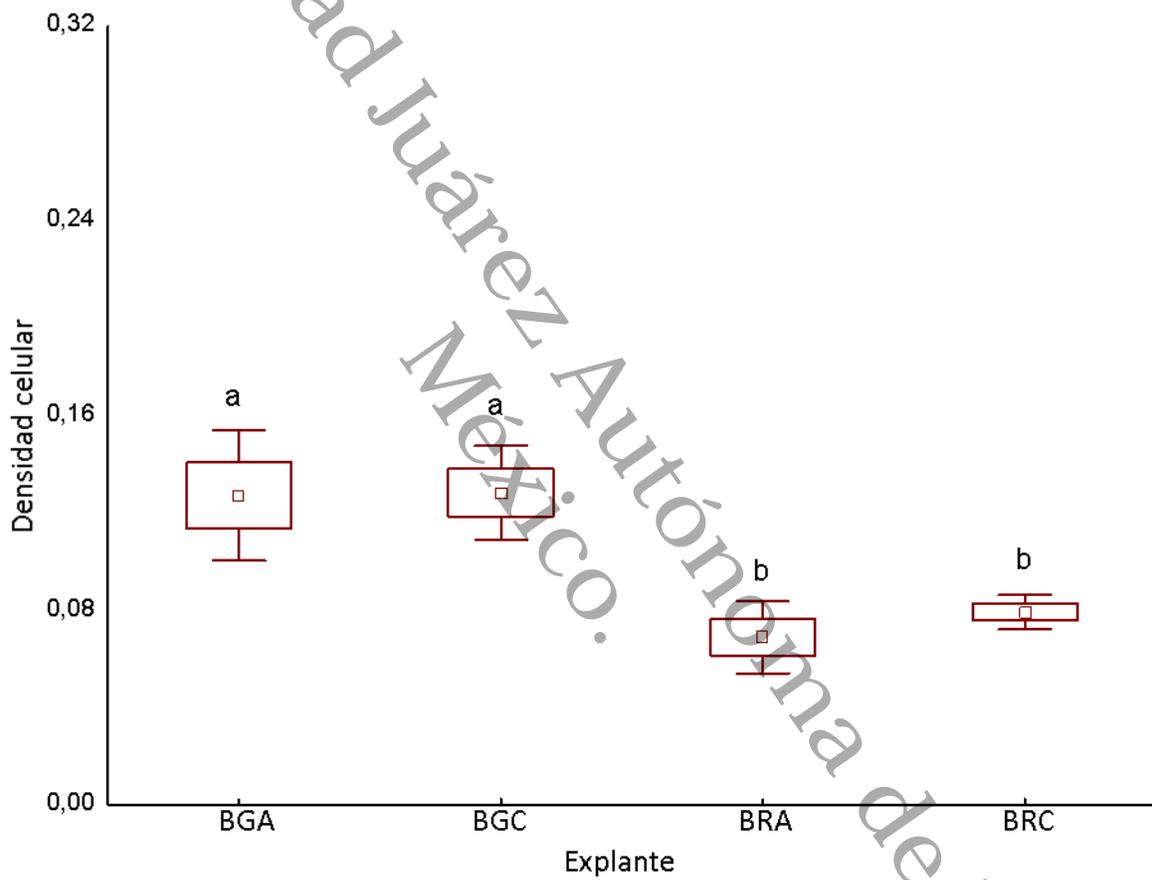
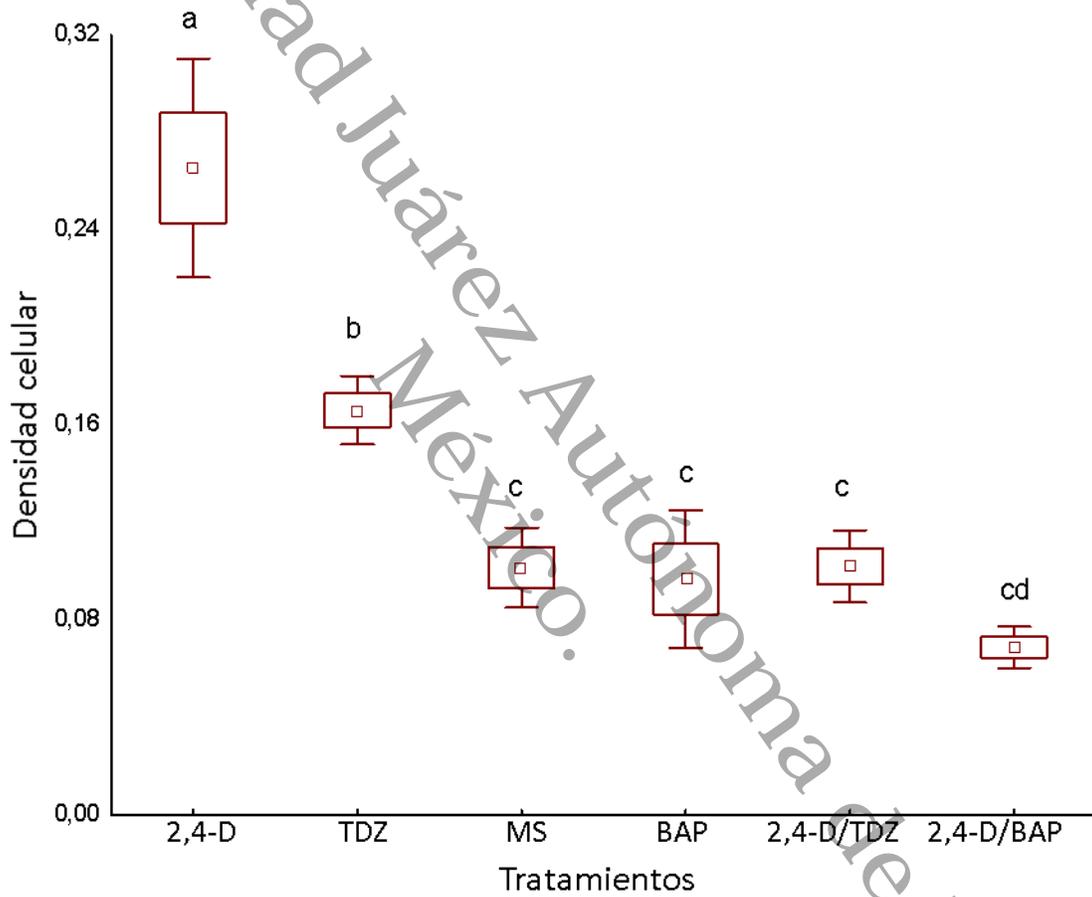


Figura 5



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

**Capítulo IV.**

Conclusiones generales



## CONCLUSIONES

El estudio de inducción embriogénica de *V. americana* determinó, que la sensibilidad al 2,4-D, TDZ y BAP en las bases caulinares de germinados fue diferenciada entre explantes disectados y completos, siendo también disimilares en la sincronía de formación de callo y la suspensión celular embriogénica.

Las bases caulinares aisladas de rametos, procedente de plantas clonadas, ofrecieron una vía novedosa para la embriogénesis indirecta de *V. americana* que puede ser aplicable a otras macrófitas sumergidas, que persiguen la finalidad de la propagación sustentable.

El efecto inductor de la embriogénesis se expresó con y sin FR; por lo que se concluye que la elevada concentración salina y la agitación del cultivo, o ambos, manifestaron efectos de estrés que dispararon la determinación y competencia celular embriogénica.

Las características del callo embriogénico, masas proembriogénicas, en términos de color, tamaño y morfología fueron similares entre los cuatro tipos de explantes, sin embargo estos evolucionaron diferencialmente.

Se concluye que las bases caulinares de germinados y clones mostraron mayor proporción de cultivos de callo embriogénico con BAP y en segundo término el TDZ, ambos en su efecto individual. En similitud, el 2,4-D favoreció más a las masas proembriogénicas y a su vez proporcionó mayor densidad celular.

Las suspensiones celulares seleccionadas para obtener cultivos embriogénicos de alta frecuencia fueron las concentraciones de 2,4-D alta y TDZ bajo usando explantes aislados y de BAP bajo en explante completo.

Los efectos inhibitorios en la formación de callo embriogénico fueron obtenidos con 2,4-D y 2,4-D/TDZ. A su vez, el TDZ inhibió las masas proembriogénicas en mayor magnitud sobre bases aisladas.



Se comprueba que la vía de formación del embrión somático de *v. americana* ocurre a través de masas proembriónicas. Y el presente estudio determinó una medida biométrica, una caracterización más precisa del tamaño de la masa proembriónica en la transición a embrión somático.

El experimento desarrollado mejoró el protocolo de embriogénesis somática de la macrófita sumergida *V. americana* a través de la producción del callo friable que produjo dispersiones celulares de carácter embriogénico en un período corto de tiempo (15 días) y fue más eficiente comparado con el sistema de explantes mezclados de germinados.

La acción de los FR ensayados deberá ser analizada en las etapas de maduración del embrión somático para definir la influencia de la complejidad del explante.

