



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

División Académica de Ciencias Biológicas



Embriogénesis somática en
Typha domingensis

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

PRESENTA

Biol. Guadalupe Hernández Piedra

ASESORA

Dra. Violeta Ruiz Carrera

Villahermosa, Tabasco. Octubre de 2012.

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISION ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Villahermosa, Tab., a 19 de Octubre de 2012

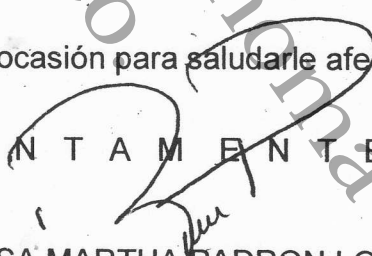
ASUNTO: Autorización de Modalidad de Titulación

C. LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON
JEFE DEL DEPTO. DE CERTIFICACIÓN Y TITULACION
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado, informo a usted, que en base al reglamento de titulación vigente en esta Universidad, ésta Dirección a mi cargo, autoriza a la **C. GUADALUPE HERNANDEZ PIEDRA** egresada de la Maestría en **CIENCIAS AMBIENTALES** de la División Académica de **CIENCIAS BIOLÓGICAS** la opción de titularse bajo la modalidad de Tesis de Maestría denominado: "**EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN TYPHA DOMINGENSIS**".

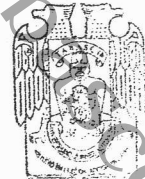
Sin otro particular, aprovecho la ocasión para saludarle afectuosamente.

A T E N T A M E N T E

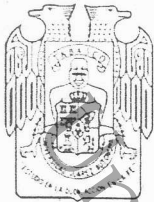

M. EN C. ROSA MARTHA PADRON LOPEZ
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

C.c.p.- Expediente Alumno de la División Académica
C.c.p.- Interesado

DIVISION ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECTOR



OCTUBRE 19 DE 2012

**C. GUADALUPE HERNANDEZ PIEDRA
PAS. DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES
PRESENTE**

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: "**EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN TYPHA DOMINGENSIS**", asesorado por la Dra. Violeta Ruiz Carrera, sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por la Dra. Erika Escalante Espinosa, Dr. Rodolfo Gómez Cruz, M. en C. María de los Angeles Guadarrama Olivera, M. en C. Arlette Amalia Hernández Franyutti.

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.

ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

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

U. J. A. T.
DIVISION ACADÉMICAS
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

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



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: **"EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN TYPHA DOMINGENSIS"**, 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 Diecinueve de Octubre del año 2012.

AUTORIZO



GUADALUPE HERNANDEZ PIEDRA

Embriogénesis somática en *Typha domingensis*

INFORME DE ORIGINALIDAD

13%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	archivos.ujat.mx Internet	589 palabras — 3%
2	hdl.handle.net Internet	184 palabras — 1%
3	cicy.repositorioinstitucional.mx Internet	144 palabras — 1%
4	link.springer.com Internet	77 palabras — < 1%
5	transparencia.tabasco.gob.mx Internet	66 palabras — < 1%
6	Guadalupe Hernández-Piedra, Violeta Ruiz-Carrera, Alberto J Sánchez, Arlette Hernández-Franyutti, Alfonso Azpeitia-Morales. " Morphohistological development of the somatic embryo of ", PeerJ, 2018 Crossref Posted Content	44 palabras — < 1%
7	konfrans.ndu.edu.az Internet	40 palabras — < 1%
8	Priyono. "Somatic embryogenesis and vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in <i>Coffea canephora</i> Pierre", Plant Cell Reports, 02/10/2010 Crossref	37 palabras — < 1%

9	colposdigital.colpos.mx:8080 Internet	37 palabras — < 1%
10	repositorio.uchile.cl Internet	36 palabras — < 1%
11	www.iufro.org Internet	35 palabras — < 1%
12	1library.co Internet	33 palabras — < 1%
13	docslib.org Internet	33 palabras — < 1%
14	ri.ujat.mx Internet	32 palabras — < 1%
15	www.scielo.cl Internet	32 palabras — < 1%
16	ebin.pub Internet	31 palabras — < 1%
17	scirpus.weebly.com Internet	31 palabras — < 1%
18	Takashi Asaeda, Le Quoc Hung. "Internal heterogeneity of ramet and flower densities of <i>Typha angustifolia</i> near the boundary of the stand", <i>Wetlands Ecology and Management</i> , 2007 Crossref	30 palabras — < 1%
19	Methods in Molecular Biology, 2016. Crossref	29 palabras — < 1%
20	ecologicalprocesses.springeropen.com Internet	29 palabras — < 1%

21	bdigital.unal.edu.co Internet	28 palabras — < 1%
22	core.ac.uk Internet	28 palabras — < 1%
23	vdoc.pub Internet	28 palabras — < 1%
24	www.clubensayos.com Internet	28 palabras — < 1%
25	www.pomics.com Internet	27 palabras — < 1%
26	"Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications", Springer Nature, 2016 Crossref	26 palabras — < 1%
27	bibliotecadigital.infor.cl Internet	26 palabras — < 1%
28	epdf.tips Internet	26 palabras — < 1%
29	mafiadoc.com Internet	26 palabras — < 1%
30	Christine Holdredge, Mark D. Bertness. "Litter legacy increases the competitive advantage of invasive <i>Phragmites australis</i> in New England wetlands", <i>Biological Invasions</i> , 2010 Crossref	25 palabras — < 1%
31	arqueozoologiaenahiia.files.wordpress.com Internet	25 palabras — < 1%

32	jweb.ahvaz.iau.ir Internet	25 palabras — < 1%
33	pergamos.lib.uoa.gr Internet	25 palabras — < 1%
34	www.tandfonline.com Internet	24 palabras — < 1%
35	medwinpublishers.com Internet	23 palabras — < 1%
36	peerj.com Internet	23 palabras — < 1%
37	www.ptolomeo.unam.mx:8080 Internet	23 palabras — < 1%
38	Boutin, Kyle David. "From Pollution to Products: Modeling a Wetland-Based Approach to Watershed Remediation and Developing a Cattail Bioproduct to Facilitate Its Implementation", North Dakota State University, 2025 ProQuest	22 palabras — < 1%
39	Mark W. Hester, Jonathan M. Willis, Taylor M. Sloey. "Field assessment of environmental factors constraining the development and expansion of Schoenoplectus californicus marsh at a California tidal freshwater restoration site", Wetlands Ecology and Management, 2015 Crossref	22 palabras — < 1%
40	journal.ipb.ac.id Internet	22 palabras — < 1%
41	rebus.us.edu.pl Internet	22 palabras — < 1%

42	repositorio.ufsc.br Internet	22 palabras — < 1%
43	www.nrcresearchpress.com Internet	22 palabras — < 1%
44	doczz.net Internet	21 palabras — < 1%
45	Ana Guilló, M ^a . Ángeles Alonso, Ana Juan. "New insights into seminal and stomatal morphology and their contribution to the taxonomy of the Old World succulent perennial Salicornioideae", Plant Systematics and Evolution, 2013 Crossref	20 palabras — < 1%
46	archive.org Internet	20 palabras — < 1%
47	lgujls.lgu.edu.pk Internet	20 palabras — < 1%
48	www.nci.nih.gov Internet	20 palabras — < 1%
49	www.researchgate.net Internet	20 palabras — < 1%
50	ambientebogota.gov.co Internet	19 palabras — < 1%
51	www.google.co.in Internet	18 palabras — < 1%
52	www.scielo.org.mx Internet	18 palabras — < 1%

53	ambiental.unam.mx Internet	17 palabras — < 1%
54	dspace.uclv.edu.cu Internet	17 palabras — < 1%
55	eprints.uanl.mx Internet	17 palabras — < 1%
56	library.unisel.edu.my Internet	17 palabras — < 1%
57	Cui, S., J. Hu, S. Guo, J. Wang, Y. Cheng, X. Dang, L. Wu, and Y. He. "Proteome analysis of <i>Physcomitrella patens</i> exposed to progressive dehydration and rehydration", <i>Journal of Experimental Botany</i> , 2012. Crossref	16 palabras — < 1%
58	www.investigacion.biblioteca.uvigo.es Internet	16 palabras — < 1%
59	U. K. Sarkar. "Biodiversity, ecohydrology, threat status and conservation priority of the freshwater fishes of river Gomti, a tributary of river Ganga (India)", <i>The Environmentalist</i> , 06/03/2009 Crossref	15 palabras — < 1%
60	ejournal.bppt.go.id Internet	14 palabras — < 1%
61	cfpub.epa.gov Internet	13 palabras — < 1%
62	Bo Zhang, Abolghasem Shahbazi, Lijun Wang, Oumou Diallo, Allante Whitmore. "Hot-water pretreatment of cattails for extraction of cellulose", <i>Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology</i> , 2010 Crossref	12 palabras — < 1%

63	ia800902.us.archive.org Internet	12 palabras — < 1%
64	livros01.livrosgratis.com.br Internet	12 palabras — < 1%
65	www.slideshare.net Internet	12 palabras — < 1%
66	ramsar.org Internet	11 palabras — < 1%
67	repositoriodigital.uns.edu.ar Internet	11 palabras — < 1%
68	repositorij.unizg.hr Internet	11 palabras — < 1%
69	en.wikipedia.org Internet	10 palabras — < 1%
70	expeditiorepositorio.utadeo.edu.co Internet	10 palabras — < 1%
71	http://159.189.96.215/resource/literatr/aqua/aqua.txt Internet	10 palabras — < 1%
72	rev.mex.biodivers.unam.mx Internet	10 palabras — < 1%
73	www.ewb-usa.org Internet	10 palabras — < 1%
74	www.int-res.com Internet	10 palabras — < 1%

75	www.mma.es Internet	10 palabras — < 1%
76	bibliotecaforestal.ufv.br Internet	9 palabras — < 1%
77	caelum.ucv.ve Internet	9 palabras — < 1%
78	ciatej.repositorioinstitucional.mx Internet	9 palabras — < 1%
79	dspace.unica.cu Internet	9 palabras — < 1%
80	patents.google.com Internet	9 palabras — < 1%
81	pdfs.semanticscholar.org Internet	9 palabras — < 1%
82	repositorio.ufla.br Internet	9 palabras — < 1%
83	84a69b9b8cf67b1fcf87220d0dabdda34414436b- www.google.com Internet	8 palabras — < 1%
84	Hilda E. Lee-Espinosa, Antonio Laguna-Cerda, Joaquín Murguía-González, Lourdes Iglesias-Andreu et al. "UN PROTOCOLO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA PARA LA REGENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN IN VITRO DE <i>Laelia anceps</i> ssp. <i>dawsonii</i> ", Revista Fitotecnia Mexicana, 2010 Crossref	8 palabras — < 1%
85	locus.ufv.br	

Internet

8 palabras — < 1%

86 repositorio.geotech.cu
Internet

8 palabras — < 1%

87 repositorio.uaaan.mx
Internet

8 palabras — < 1%

88 revistas.unal.edu.co
Internet

8 palabras — < 1%

89 www.gob.mx
Internet

8 palabras — < 1%

90 Inaê M. Araújo Silva-Cardoso, Filipe S. Meira, Ana C. M. M. Gomes, Jonny E. Scherwinski-Pereira. " Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree ", *Physiologia Plantarum*, 2019
Crossref

7 palabras — < 1%

91 *Soil Biology*, 2009.
Crossref

7 palabras — < 1%

92 Xiyan Yang. "Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants", *Critical Reviews in Plant Sciences*, 01/2010
Crossref

7 palabras — < 1%

93 repositorio.unal.edu.co
Internet

7 palabras — < 1%

94 "Phytoremediation Potential of Bioenergy Plants", Springer Science and Business Media LLC, 2017
Crossref

6 palabras — < 1%

95 Joseph Francis Ree, Miguel Pedro Guerra. "Palm (Arecaceae) somatic embryogenesis", In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2015 6 palabras — < 1%
Crossref

EXCLUIR CITAS

DESACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

DESACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS

DESACTIVADO

Dedicatoria

A mis tres hermosos hijos:

Jesús Miguel Adonis, José Abel y Rubí Concepción

Salvador Hernández

A ustedes tres solecitos que son la fuerza y motivación de mi vida, la razón por la cual no miro atrás, la razón por la cual no me importa que tan largo y sinuoso sea el camino. Espero poder transmitirles que con amor y dedicación todo se puede lograr.

A mi madre:

Sra. Concepción Piedra Martínez

A usted que es sinónimo de fuerza y esperanza. Que cree en mí y en lo que hago, que con sacrificio y dedicación a cuidado de mis hijos, con un amor incondicional.

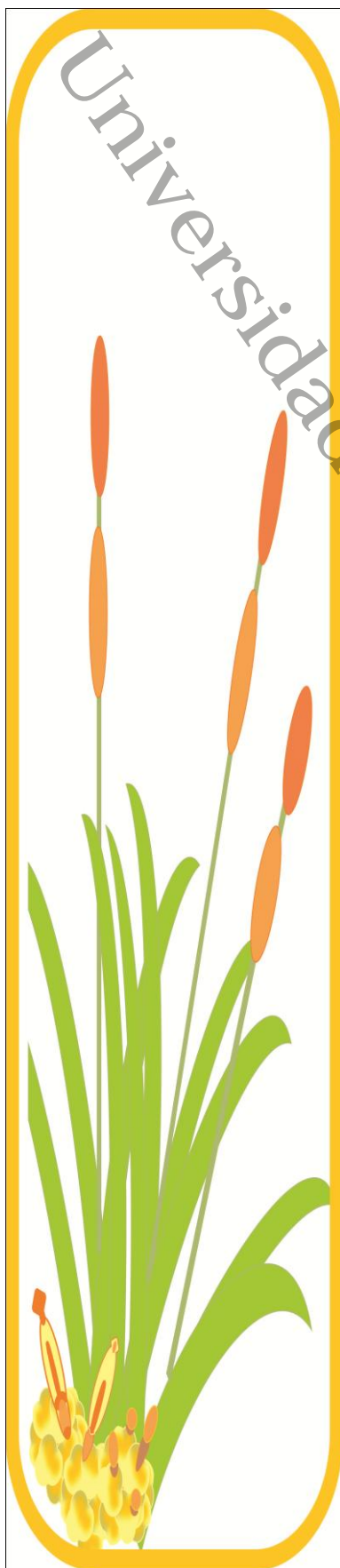
A mi esposo:

Sr. Pablo Salvador García

Por su amor

“A ustedes con todo mi amor les dedico este trabajo”

Jupita H.P.



Agradecimientos

A **Dios** por darme fuerza, fe, salud, sabiduría y perseverancia para alcanzar una meta más.

A mi **familia** por su apoyo, comprensión y cariño durante la realización de este proyecto de vida.

A mi **asesora**, la **Dra. Violeta Ruiz Carrera** por su dedicación, confianza y amistad. Por su ejemplo y rectitud, muchas gracias.

A los **profesores** que me asistieron durante el desarrollo de este documento y me brindaron toda su experiencia y conocimiento; **Dra. Erika Escalante Espinosa**, **Dr. Rodolfo Gómez Cruz, M. en C. Ma. De los Ángeles Guadarrama Olivera** y **M. en C. Arlette Amalia Hernández Franyutti**.

A mis **amigos** y **compañeros Manuel, Romayra y Mario** por su ánimo. A un gran maestro y amigo **Moisés**, por brindarme todo su apoyo y experiencia en el laboratorio de histología animal. A los tesisistas y prestadores de servicio social del laboratorio de biotecnología vegetal, especialmente a **Yesenia y Jesús**.

“Es largo y sinuoso el camino al éxito, y no me refiero al éxito vano y material si no a aquel que le da razón a nuestra existencia. Ese éxito que te da la satisfacción y la alegría de que lo que haces lo haces con gusto y dedicación”.

Jupita J.P.

Contenido

Resumen general	1
-----------------	---

Capítulo I. Introducción

Enfoque del problema	4
Enfoque científico	6
Planteamiento de Hipótesis	8
Definición de objetivos	8

Capítulo II. Caracterización del proceso de embriogénesis somática en *Typha domingensis*

Resumen	10
Introducción	11
Método	14
Especie de estudio	14
Material vegetal	15
Viabilidad de semillas	15
Evaluación experimental	16
Medio de cultivo	16
Diseño Experimental	16
Resultados	17
Discusión	29
Evaluación morfológica de la embriogénesis somática	29
Efecto del factor auxina-ambiente en la competencia embriogénica de <i>Typha domingensis</i>	32

Capítulo III. Proceso multietapas de embriogénesis somática en *Typha domingensis*

Resumen	36
Introducción	37
Método	39
Análisis estadístico	41
Resultados	42
Discusión	51

Capítulo IV. Histodiferenciación en embriones somáticos de *Typha domingensis*

Resumen	56
Introducción	57
Método	59
Preparación y caracterización de tejidos	59
Resultados	61
Discusión	73

Capítulo V. Conclusión general

Conclusión	80
------------	----

Referencias	82
--------------------	----

Índice de Tablas y Figuras	93
-----------------------------------	----

Anexos	102
---------------	-----

Resumen general

En los humedales la vegetación acuática emergente, se encuentra amenazada por la desaparición de este territorio a causa del cambio de uso del suelo, la eutrofización, el cambio climático y por su reciente interés como fuente bioenergética y alimenticia. Las hidrófitas emergentes en los humedales del continente americano están dominadas por *Typha domingensis* y por su amplia distribución representa la especie ecológica clave para conservar la funcionalidad y los servicios ambientales del ecosistema acuático. Para profundizar en los aspectos biológicos de la reproducción de esta hidrófita es factible la embriogénesis somática. La técnica *in vitro* de embriogénesis somática permite desarrollar un sistema modelo para estudios embriológicos y constituye la estrategia ideal para las aplicaciones inmediatas de repoblación y conservación de germoplasma de *T. domingensis*.

En la embriogénesis somática de *T. domingensis* el explante fue el germinado aséptico cultivado en medio de cultivo MS_{0.5} enriquecido con 3% de sacarosa. El método de embriogénesis fue dividido en dos fases. La fase I se desarrolló con etapas de inducción durante 56 días y maduración de embriones somáticos por 30 días. La fase II, comprendió las etapas embriogénicas de inducción y expresión y la de maduración, cada una de 28 días.

La inducción embriogénica de la fase I se evaluó en concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 mg·L⁻¹ de 2,4-D en ambientes de luz y oscuridad y la de maduración del embrión fue sin 2,4-D en luz y oscuridad. Las respuestas sobre el explante fueron el abultamiento en la base caulinar y la formación de callo blanco, callo amarillo nodular adherido y embrión somático. En el medio de cultivo las respuestas fueron el microcallo amarillo friable, las células suspendidas y la turbidez. El 2,4-D influyó en el porcentaje de cultivos que presentaron abultamiento y callo amarillo nodular ($p < 0.05$) y la frecuencia de abultamientos y callo nodular fue mayor en concentraciones de 0.5 y 1 mg·L⁻¹ de 2,4-D. Durante la etapa de maduración los

callos embriogénicos y los embriones somáticos mostraron obscurecimiento progresivo. Los resultados de la fase I que condujeron al desarrollo de embrión somático maduro se usaron para diseñar la fase II de embriogénesis somática para *T. domingensis*.

En la fase II, el medio de cultivo presentó 10 mg L^{-1} de ácido ascórbico para prevenir la oxidación de embriones. La inducción embriogénica se estableció en oscuridad y $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D. En la etapa de expresión embriogénica el efecto del 2,4-D en 0.5, 1 y $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ fue analizado en oscuridad. En la última etapa fue el ambiente de luz y oscuridad sin 2,4-D. El 2,4-D mostró efecto significativo en la formación de callo amarillo, café y en las células suspendidas. La adición de ácido ascórbico retrasó el obscurecimiento y aceleró la formación de embriones somáticos. En todas las etapas la asincronía en el desarrollo del embrión somático fue persistente, predominando la forma oblonga más que la cotiledonar. El mapa destino y la aproximación al modelo básico de embriogénesis somática indirecta de *T. domingensis* son descritos, así como otras vías embriogénicas y organogénicas para masificar embriones somáticos de esta hidrófita emergente. La ruta morfogénica y el estado de madurez de los embriones somáticos de *T. domingensis* se caracterizaron mediante el estudio histológico del 30% de las muestras de cada tratamiento y etapas de la Fase II. Los callos sobre el explante revelaron zonas de células meristemáticas y embriogénicas de elevada actividad y un gradiente de diferenciación del embrión somático en todas las fases de cultivo. La morfogénesis de *T. domingensis* mostró una ruta embriogénica indirecta y unicelular. El embrión evolucionó hasta la etapa cotiledonar en ausencia y presencia de luz, y presentó capa, masa y tubo proembrional y suspensor.

En la presente investigación se generó el modelo *in vitro* de morfogénesis embriogénica de *T. domingensis* y la ruta descrita culminó con el desarrollo de un embrión somático maduro. Aunque el cultivo embriogénico fue diagnóstico de baja frecuencia, la vía de suspensiones celulares para la embriogénesis somática representa una alternativa para la obtención del protocolo eficiente y sincrónico de *T. domingensis*.

Introducción

Enfoque del problema

Los estudios científicos biológicos, ecológicos y tecnológicos que involucran a las plantas acuáticas de las zonas costeras incrementaron sustancialmente en las últimas décadas. El interés por estudiar las plantas acuáticas ha resurgido por su condición de vulnerabilidad ante las diversas amenazas antropogénicas y ambientales sobre lagunas, estuarios, manglares y humedales. Entre estos destaca el desplazamiento físico para otro uso de suelo, los desarrollos urbanos, portuarios y turísticos, la ampliación de la frontera agropecuaria y acuícola, el enriquecimiento de nutrientes, así como el presente cambio climático (Dokulil & Teubner 2011; ECOred 2011; Kirwan & Guntenspergen 2010; Kirwan *et al.* 2010; Nicholls 2004; Gibbs 2000).

De todos los ecosistemas, los humedales son los más productivos de la biosfera (Junk 1989) y esta característica es conferida por la amplia distribución y abundancia de comunidades de hidrófitas emergentes en el ecotono, mismas que hasta hace poco eran consideradas malezas (Brugnoli & Boccardi 2005; Zedler & Kercher 2004). En contraste la habilidad de crecimiento de las malezas ha sido trascendental para desarrollar y comprobar teorías ecológicas en aguas someras (Brix *et al.* 2002; Smith & Newman 2001; Miao *et al.* 2001; Lorenzen *et al.* 2000). La destrucción de humedales del último siglo, así como los cambios climáticos recientes, los sitúan entre los de mayor riesgo de desaparición en el planeta (Erwin 2009; Touchette & Steudler 2009; Hershner & Havens 2008; Nicholls 2004). El dilema ambiental de los humedales genera una crisis significativa en la disponibilidad de diversos recursos potencialmente valiosos para la vida acuática y en los servicios ambientales que sustenta. En la zona costera del Golfo de México se augura una reducción de más del 40% (Pachauri & Reisinger 2007) y se desconoce las consecuencias de este impacto en particular sobre la vegetación acuática emergente.

Recientemente, las hidrófitas emergentes son valoradas y estudiadas como recursos por presentar composición química con perspectivas potenciales para su aprovechamiento integral, ya que solo *Oryza sativa* es la única planta acuática emergente cultivada para consumo humano. El uso limitado de otras especies de este grupo ecológico coincide con la escasez de información científica, biológica, ecológica y tecnológica debido a su condición de marginación (Cronk & Siobhan 2001). Diversas especies acuáticas emergentes forman ahora parte de varios programas de investigación para su producción masiva, conservación y/o aprovechamiento potencial (Sheehan *et al.* 1998) en la industria farmacéutica (Abu-Ziada *et al.* 2008; Basso *et al.* 2005), alimenticia (Banack *et al.* 2004; Arenas & Scarpa 2003; Pemberton 2000; Stevens & Hoag 2000) de fitorremediación (Skinner *et al.* 2007; Sheoran 2006; Paris *et al.* 2005; Hidalgo *et al.* 2005; Odjegba & Fasidi 2004; Vara Prasad & De Oliveira 2003; Estime *et al.* 2003; Rogers, 2003) y energética (Hernández-Piedra 2009; Suda *et al.* 2009; Li *et al.* 2009; Sheehan *et al.* 1998)

Entre la vegetación acuática emergente la más común en los humedales de Norte y Centro América es *Typha domingensis*. El desconocimiento social del valor ecológico de *Typha*, su uso comercial limitado y proliferación en las lagunas y humedales ha conducido a la implementación de prácticas inadecuadas en el manejo de este ecosistema (Linz & Homana 2011; Tulbure *et al.* 2007). *Typha domingensis* se emplea en la construcción de humedales artificiales para descontaminar aguas residuales, así como especie de ornato y recurso alimenticio (Arenas & Escarpa 2003; Stevens & Hoag 2000). El enfoque más reciente es su aprovechamiento como fuente de biocombustible (Hernández-Piedra 2009; Suda *et al.* 2009) e industrialización para generar diversos productos.

Lo anterior, potencializa la vulnerabilidad ecológica de *T. domingensis* en los humedales costeros y crea la necesidad de desarrollar investigación básica con herramientas *in vitro* que permitan entender la biología del desarrollo y la propagación de la especie sin comprometer el funcionamiento y manejo del

ecosistema; y además por la ventaja que ofrece este conocimiento hacia las aplicaciones tecnológicas.

Enfoque científico

En la producción y conservación de plantas se ocupa cada vez más la embriogénesis somática porque ofrece múltiples ventajas respecto a los métodos convencionales de investigación básica. La embriogénesis somática es una herramienta moderna basada en el cultivo *in vitro*. La generación de embriones somáticos debe su éxito a la multiplicación práctica y porque representa una forma eficiente para la conservación del germoplasma. Incluso, constituye el sistema ideal para cualquier tipo de mejoramiento genético. Colateralmente esta estrategia biotecnológica augura un gran potencial para generar el conocimiento básico y aplicado de hidrófitas emergentes económicamente potenciales o ecológicamente valiosas. Hoy en día, la regeneración por embriogénesis somática es aplicada en las hidrófitas emergentes *Phragmites australis* (Máthé *et al.* 2000; Lauzer *et al.* 2000), *Brasenia schreberi* (Oh *et al.* 2008) y *Sium latifolium* (Popova & Ivanenko 2007). La producción de embriones somáticos *in vitro* presenta una enorme capacidad de multiplicación aplicable, ya que en un solo proceso produce estructuras completas con ápice y raíz para diferentes fines de investigación, por lo que presenta muchas ventajas frente a otros sistemas de propagación de plantas.

Recientemente el sistema *in vitro* está ofreciendo posibilidades únicas para la investigación básica en el entendimiento de la totipotencialidad y los factores que controlan la dirección y el ritmo del desarrollo posterior del embrión (Santa-Catarina *et al.* 2006; Blanco *et al.* 2003; Krikorian & Simola 1999). La embriogénesis somática constituye un sistema modelo para estudios embriológicos, principalmente por su factibilidad, rápida respuesta y alta productividad (Von Arnold 2008; Quiroz-Figueroa *et al.* 2006; Fehér *et al.* 2003). Dicha técnica se fundamenta en el uso de fitorreguladores sintéticos de crecimiento para inducir la transición de una célula somática a una embriogénica

(Fehér *et al.* 2003). El 2,4-D es la auxina más empleada por sus múltiples efectos, como en la activación de las diferentes fases del ciclo celular que es un proceso clave en la diferenciación (Fehér *et al.* 2003). La composición del medio y la luz, son otros factores que regulan el proceso de embriogénesis ya que estos elementos pueden controlar la división celular, elongación, polaridad y diferenciación (Quiroz-Figueroa *et al.* 2006; Dodeman *et al.* 1997; Roca & Mroginski 1991). La optimización del sistema depende entonces en gran medida del esclarecimiento de los requerimientos ambientales y nutricionales necesarios para la especie.

Los diferentes estados del desarrollo embriogénico asociados a la diferenciación embriogénica, permiten aportar información que enriquece la biología del desarrollo. Sin embargo la correlación entre la apariencia de una estructura tipo embriogénica y una verdaderamente embriogénica solo puede confirmarse por estudios histológicos (Quiroz-Figueroa *et al.* 2006; Rugkhla & Jones 1998). Otros métodos promisorios para identificar los mecanismos regulatorios responsable de los eventos claves de la embriogénesis son los de análisis molecular y genéticos (Dodeman *et al.* 1997).

En consonancia a lo expuesto es necesario impulsar estudios que permitan entender procesos básicos reproductivos de *T. domingensis*, ya que es una especie emergente abundante con riesgo de pérdida o declinación en sus poblaciones como consecuencia de un estrés múltiple producto del trinomio cambio climático - contaminación – cultivo potencial.

Aunque la embriogénesis somática se ha estudiado en diferentes especies modelos estas no son comparables (Dodeman *et al.* 1997), por lo tanto la aplicación de esta técnica a *T. domingensis* proporcionará información valiosa para aplicaciones inmediatas con perspectiva ambiental o tecnológica.

Planteamiento de la hipótesis

En la investigación fue relevante definir las condiciones óptimas de cultivo *in vitro* y la ruta morfogénica de *Typha domingensis* que culminan en la formación de embriones somáticos maduros.

La hipótesis de investigación se formuló con base en los factores críticos que desencadenan y regulan el proceso de embriogénesis somática, como la influencia de la complejidad del explante, la concentración del fitorregulador embriogénico 2,4-D y la variación de luz en los cultivos *in vitro*. En *T. domingensis* la hipótesis fue que “el 2,4-D estimula la embriogénesis en los explantes de germinados y la expresión de la competencia embriogénica conduce a la morfogénesis del embrión somático maduro en las etapas secuenciales de cultivo *in vitro*”.

Definición de Objetivos

Objetivo General

Describir el modelo de embriogénesis somática en la hidrófita emergente *Typha domingensis* y la relación de los factores que condicionan la formación de embriones maduros.

Objetivos específicos

- Iniciar el sistema de embriogénesis somática de *T. domingensis* utilizando como explante germinados *in vitro* completos.
- Evaluar el efecto del 2,4-D en condiciones de luz y oscuridad en la formación de callo embriogénico y el desarrollo de embriones somáticos.
- Caracterizar la morfogénesis progresiva de las estructuras embriogénicas inducidas.
- Establecer el modelo de embriogénesis en secuencia multietapas.
- Determinar el origen del embrión somático.

**Caracterización del proceso de embriogénesis somática
en *Typha domingensis***

Resumen

El proceso de embriogénesis somática de la hidrófita emergente *Typha domingensis* se caracterizó en las etapas de inducción y maduración embriogénica. Los germinados asépticos de *T. domingensis* fueron cultivados 56 días en medio nutritivo de MS_{0.5} en agitación. En la inducción embriogénica se usaron concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 mg·L⁻¹ de 2,4-D en ambientes de luz y oscuridad. La maduración del embrión fue evaluado en medio de cultivo fresco sin 2,4-D y con luz por 30 días. Los marcadores embriogénicos desarrollados secuencialmente sobre el explante fueron el abultamiento en la base caulinar, callo blanco, callo amarillo nodular adherido y embrión somático. En el medio de cultivo surgió el microcallo amarillo friable, células suspendidas y la turbidez. El 2,4-D influyó en el porcentaje de cultivos que presentaron abultamiento y callo amarillo nodular ($p < 0.05$). La frecuencia de abultamientos y callo nodular fue mayor a concentraciones de 0.5 y 1 mg·L⁻¹ de 2,4-D. Durante la etapa de maduración los callos embriogénicos y los embriones somáticos mostraron obscurecimiento progresivo. El tiempo de máxima producción de cultivos con las estructuras morfológicas que condujeron al desarrollo de embrión somático maduro fue usado para diseñar la embriogénesis somática de *T. domingensis* en un protocolo multietapas para futuras investigaciones.

Introducción

La espadaña (*Typha domingensis*) es una planta acuática emergente que muestra amplia distribución y elevada productividad en los ecosistemas limnéticos someros. Actualmente, el espadañal enfrenta dos dilemas: ser tratado como maleza y la amenaza de sobreexplotación. Las malezas acuáticas son consideradas un riesgo natural dentro de los intereses y actividades económicas del hombre por su elevada productividad (Auld 1996), no obstante que la abundancia de esta vegetación constituye un componente clave para la sustentabilidad ambiental del ecosistema acuático (Zedler 2004; Lorenzen *et al.* 2000). A escala mundial las malas prácticas de manejo, sumadas a los impactos del cambio climático, amenazan la dinámica y el tamaño de las comunidades de vegetación acuática emergente (Pachauri 2007; Auld 1996) y se prevé que ambos afectarán negativamente los servicios ambientales que estas brindan al ecosistema.

La amenaza de sobreexplotación del género *Typha* reside en su potencial como materia prima para biocombustible de tercera generación (Hernández-Piedra 2009; Suda *et al.* 2009; Czako *et al.* 2006; Estime *et al.* 2003; Rogers 2003). También es usado con menor impacto en la construcción de humedales artificiales para remediar aguas eutrofizadas (Sheoran 2006; Paris *et al.* 2005; Hidalgo *et al.* 2005; Odjegba & Fasidi 2004; Vara Prasad & De Oliveira 2003; Estime *et al.* 2003; Rogers 2003), como especie de ornato, recurso alimenticio (Stevens & Hoag 2000; Arenas & Escarpa 2003) y otras aplicaciones medicinales menos conocidas. La vulnerabilidad potencial de *T. domingensis* requiere desarrollar investigación sobre su biología del desarrollo y generar métodos de propagación modernos y eficientes que eviten la sobreexplotación o probable erradicación de esta especie por el manejo inadecuado del ecosistema acuático.

El cultivo *in vitro* ofrece la oportunidad de desarrollar ciencia básica sobre la biología del desarrollo de *T. domingensis*, ya que existe poco conocimiento al respecto y a su vez, permite producir a mayor escala y alta velocidad plantas a

través de la manipulación de los componentes químicos y físicos del sistema de cultivo. El cultivo *in vitro* inicia con el establecimiento de microestructuras vegetales que se regeneran mediante procesos de organogénesis y embriogénesis somática directa e indirecta (Roca & Mroginski 1991). La embriogénesis somática ha sido usada como un sistema modelo clave para estudios embriológicos (Von Arnold 2008; Quiroz-Figueroa *et al.* 2006; Dodeman *et al.* 1997).

La embriogénesis somática directa deriva de células predeterminadas embriogénicamente, mientras que en la indirecta generalmente es de un callo (Von Arnold 2008). En la división, elongación, polaridad, diferenciación celular que conduce a la embriogénesis somática participan una amplia variedad de señales moleculares y ambientales (Roca & Mroginski 1991; Dodeman *et al.* 1997). Las moleculares incluyen compuestos exógenos, como los reguladores de crecimiento y nutrientes, y compuestos extracelulares entre las que se han citado a los polisacáridos de pared celular y glicoproteínas (Von Arnol 2008; Quiroz-Figueroa *et al.* 2006; Fehér *et al.* 2003). La auxina 2,4-D ha sido el fitorregulador comúnmente empleado en las rutas embriogénicas directa o indirecta (Machakova *et al.* 2008; Jenik & Barton 2005). En *Vallisneria americana* (Álvarez 2007), *Phragmites australis* (Máthé *et al.* 2000), *Brasenia schreberi* (Oh *et al.* 2008) y *T. domingensis* usaron el 2,4-D en concentraciones de ≤ 1 , ≥ 4 , ≤ 3 y ≤ 2 mg·L⁻¹, respectivamente para la inducción embriogénica directa. En *Nymphoides cristatum* (Niranjan *et al.* 2008), *Typha latifolia* (Rogers *et al.* 1998) y *Picea abies* (Filonova *et al.* 2000) se ha combinado el 2,4-D con otras fitohormonas como picloram, tiaduzuron y benziladenina. En muchos sistemas, el proceso de maduración del embrión somático procede en condiciones libres de auxina (Fehér 2008). En las especies como *T. latifolia* (Rogers *et al.* 1998), *P. abies* (Filonova *et al.* 2000), *P. australis* (Máthé *et al.* 2000), *V. americana* (Álvarez 2007), *B. schreberi* (Oh *et al.* 2008) y *N. cristatum* (Niranjan *et al.* 2008), la iluminación de los cultivos (presencia o ausencia) fue un factor en la inducción del embrión somático.

En esta investigación el interés fue describir el desarrollo morfológico de embriones de *T. domingensis* a través del proceso progresivo de embriogénesis somática en relación con un gradiente de 2,4-D en la etapa de inducción, y la ausencia de 2,4-D en la etapa de maduración del embrión somático. Ambas etapas fueron evaluadas en condiciones de luz y oscuridad. La descripción morfológica del proceso de embriogénesis somática es relevante para ampliar el conocimiento de la biología reproductiva de *T. domingensis* y puede mejorar las aplicaciones prácticas al conducir a una alternativa de propagación sustentable y de rehabilitación de ecosistemas limnéticos impactados (Linz & Homana 2011; T´ulbure *et al.* 2007).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Método

Especie de estudio

Typha domingensis Pers. forma parte de la vegetación acuática enraizada emergente. Se encuentra a lo largo de todo el continente Americano (Lot *et al.* 1999; Novelo & Ramos 2007) y en México está ampliamente distribuida en las regiones cálidas húmedas por debajo de los 1000 m de altitud (Rzedwski & Rzedwski 2005). Esta planta herbácea perenne presenta un rizoma estolonífero, hojas simples lineares y tallos que emergen del agua alcanzando una altura máxima de 2.5 m. La inflorescencia terminal de color café claro en forma de espiga alargada y cilíndrica se sitúa sobre una bráctea linear. La espiga masculina hasta de 42 cm de largo y 1.5 cm de ancho se encuentra sobre la espiga femenina de 48 cm de largo y 2 cm de diámetro. Esta especie llega a producir 250 000 flores por inflorescencia. Los frutos son secos tipo aquenio de aproximadamente 1.5 mm de largo (Figura 2.1), el cual contiene una semilla diminuta de endospermo farinoso (Judd *et al.* 2008; Stevens & Hoag 2000). El aquenio está cubierto de un folículo persistente denominado perianto que le ayuda a su dispersión (Novelo & Ramos 2007; Lot *et al.* 1999).



Figura 2.1. Morfología de *Typha domingensis*. (a): esporofito. (b): inflorescencia estaminada (estrella) y carpelada (circulo). (c): aquenio con perianto. (d): semilla. (e): disección de semilla en testa (estrella) y embrión cigótico (flecha). (c) = 16x y (d) (e) = 32x.

Material vegetal

Las semillas de *T. domingensis* provinieron de aquenios almacenados 18 meses en un desecador de sílica gel. Los aquenios se recolectaron en el año 2008 en un microembalse artificial urbano (17° 59'26" y 17° 59'17" N y 92° 58'16" y 92°58'37" O) ubicado en la ciudad de Villahermosa, Tabasco, México. El almacén de aquenios del año 2008 se usó en esta investigación porque en los años 2009 y 2010 fue difícil la renovación. Lo anterior debido a que las plantas no presentaron sincronía en su ciclo reproductivo por el estrés hídrico que causó la precipitación pluvial excesiva durante este periodo en la zona costera de Tabasco (López 2009; Motivans & Apfelbaum 1987; Apfelbaum 1985).

Viabilidad de semillas

La viabilidad de las semillas de *T. domingensis* se comprobó mediante ensayos de germinación *in vitro* en cultivo estático. El aquenio fue agitado cuatro ocasiones en agua purificada (Corning Stirrer-Hot plate) en una proporción de 1:100 g/mL para desprender el perianto (Lorenzen *et al.* 2000; Sobrero *et al.* 1993). A cada intervalo de 20 min se separó parte de perianto suspendido del sobrenadante. Las semillas fueron preesterilizadas 10 min en 30% de etanol, esterilizadas 10 min en solución NaClO (10% de Cloralex® v/v) y lavadas tres veces en agua estéril. En cada transferencia se aplicó agitación manual. La prueba de germinación se realizó con 10 (± 1) semillas. La unidad de germinación fueron frascos comerciales cilíndricos de vidrio (\varnothing 5 cm: h 7 cm) con 50 mL de agua purificada y esterilizados con tapas de policarbonato Magenta® a 121° C y 104 kPa durante 25 min. Las plantas se regeneraron en cuartos de cultivo con temperatura ambiental de 25 \pm 5 °C, luz blanca de 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y fotoperiodo de 16:8 h luz: oscuridad (Control Stanley, modelo 51191). El porcentaje de germinación se estimó a 9 días [% G= (semilla germinadas/semillas totales) x 100] usando como referencia la morfología descrita para germinados del orden Poales (Tillich 2007). El procedimiento de germinación se repitió para proporcionar plantas *in vitro* en la etapa experimental, las cuales se regeneraron en lotes de 100 \pm 50 semillas.

Evaluación experimental

Medio de cultivo

En los experimentos el medio cultivo fue el de Murashige & Skoog (1962) con vitaminas, a la mitad de su fuerza iónica o MS_{0.5} (Phytotechnology® Laboratories M519), con 3% de sacarosa y el fitorregulador embriogénico 2,4-D (Sigma®, D7299). El pH del medio nutritivo fue ajustado a 5.8±2. Las unidades de cultivo fueron esterilizadas con 25 ml de medio. La unidad de cultivo y la esterilización fueron similares a la etapa de germinación.

Diseño experimental

Para la inducción de embriones somáticos de *T. domingensis* se usó el diseño factorial aleatorio 2 x 3. Los factores y sus niveles fueron: el ambiente luz y oscuridad y concentraciones de 0.0, 0.5, 1 y 2 mg·L⁻¹ de 2,4-D. Los controles sin 2,4-D se usaron en los dos tratamientos ambientales. En la unidad experimental se cultivaron tres explantes y cada tratamiento fue de ocho réplicas. El explante fue el germinado *in vitro* completo de nueve días de edad. El juego experimental luz fue colocado en el cuarto de cultivo en las condiciones normales citadas previamente. El de oscuridad se aisló de la luz en caja de cartón cerrada.

El experimento permaneció ocho semanas (sin subcultivos) y cada siete días se registraron visualmente los cambios en la morfología del explante y las estructuras que desarrollaron en el medio de cultivo. Los cambios morfológicos registrados sobre el explante fueron abultamiento, callo amarillo compacto o nodular, callo blanco, callo café o necrótico y embriones somáticos. Las respuestas registradas en el medio de cultivo fueron células suspendidas, callo amarillo friable, callo blanco friable y turbidez. Con la finalidad de explorar si las estructuras morfológicas denominadas embriogénicas pueden evolucionar hasta embrión maduro fueron subcultivadas en medio fresco MS_{0.5} sin fitorregulador y colocadas en condiciones de luz y oscuridad. Las observaciones fueron realizadas semanalmente por un periodo de 30 días.

Resultados

El porcentaje de germinación del banco de semillas de *T. domingensis* fue de 60 ± 10 . El germinado presentó hipérfilo cotiledonar largo y delgado con la testa en su parte superior, el cual produjo un fanerómero verde. El hipocótilo fue corto con un estrecho collar de rizoides largos y densos. La raíz primaria fue delgada y pronto se hizo acompañar de una fuerte raíz que nació del brote. Las primeras hojas plumulares fueron eófilos lineares (Figura 2.2).

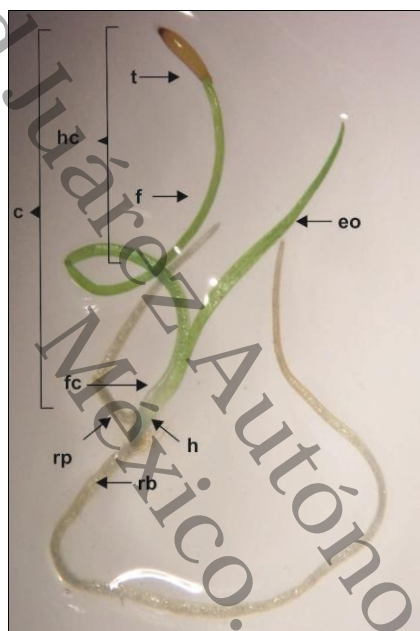


Figura 2.2. Germinado *in vitro* de *Typha domingensis* de 9 días de edad. c: cotiledón. hc: hipérfilo cotiledonar. fc: funda cotiledonar. t: testa. f: fanerómero. h: hipocótilo. rp: raíz primaria. rb: raíz del brote axilar. eo: eófilo. 8X.

En la etapa de inducción embriogénica, derivaron diversas estructuras embriogénicas sobre el germinado y el medio de cultivo de *T. domingensis* inherentes al proceso de embriogénesis somática.

En el germinado, las morfologías identificadas secuencialmente fueron el engrosamiento de la base caulinar o abultamiento, formación de callo blanco y callo amarillo nodular y embrión somático (Figura 2.3).

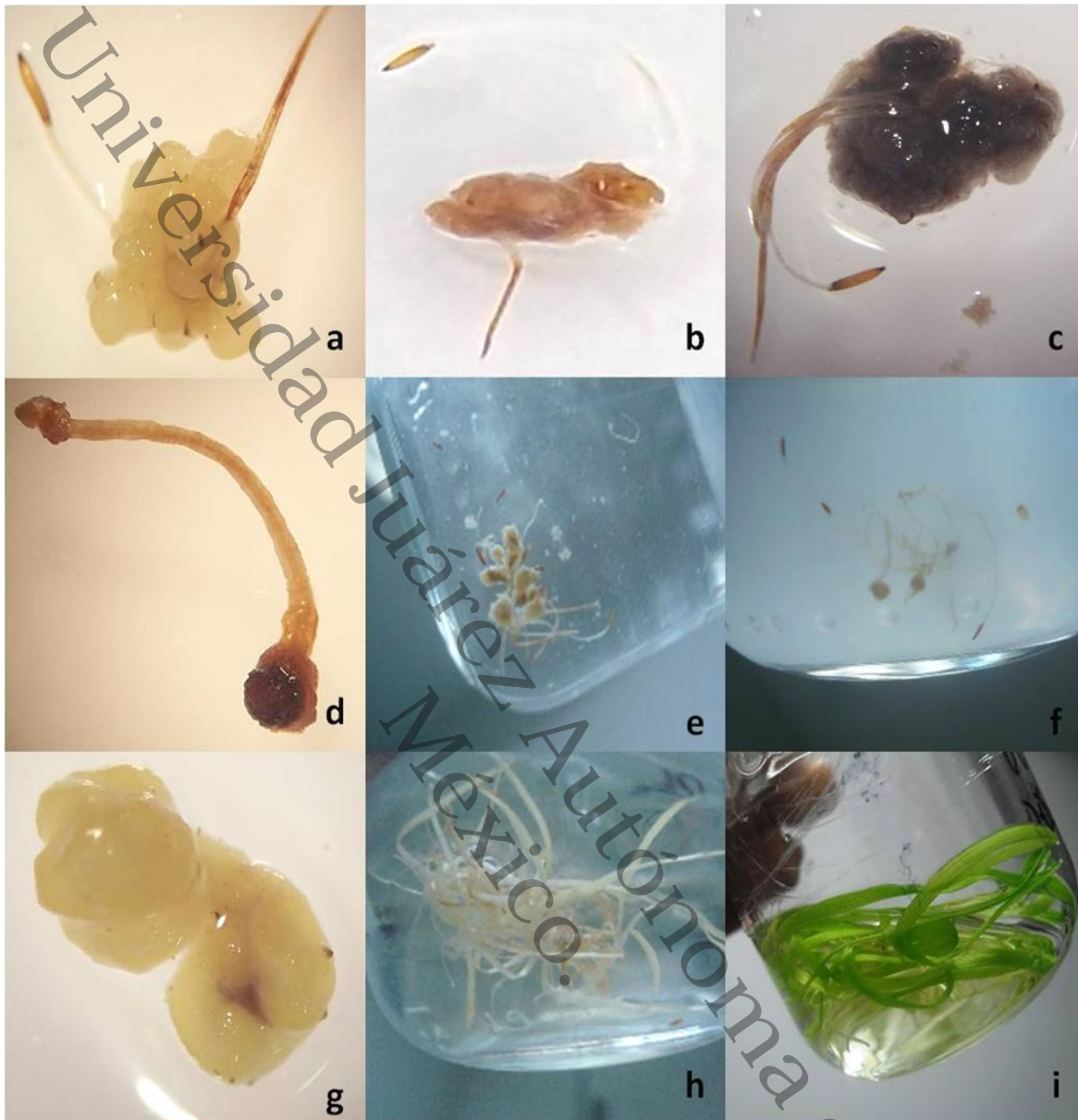


Figura 2.3 Morfología generada sobre el explante de *Typha domingensis* en la etapa experimental I, sobre el explante (a) (b) (c) (d) y desprendida del explante (e) (f) y (g). (a): Callo amarillo nodular. (b): Callo amarillo nodular con necrosis moderada. (c): callo amarillo nodular con necrosis intensa. (d): Embrión somático. (e): Células suspendidas. (f): Turbidez. (g): Callo amarillo nodular friable. (h): *T. domingensis* de 30 días de edad en oscuridad. (i): *T. domingensis* de 30 días de edad con luz. (a) (b) y (c) =8x y (d) (g) = 16x.

El callo amarillo del explante fue compacto e irregular, de aspecto nodular y pequeño de aproximadamente 0.5 cm (Figura 2.3 a), mientras que el callo blanco fue globular translúcido y se mantuvo disperso alrededor del explante. El embrión somático surgió del callo amarillo. Los embriones somáticos con forma de cono alargado en color café (Figura 2.3 d y 2.4) con una base o suspensor unida al explante y a una semiesfera de color beige en el extremo distal (Figura 2.4 b).

Las morfologías desarrolladas en el medio de cultivo fueron el callo amarillo friable o microcallo y las células suspendidas; también se produjo turbidez (Figura 2.3 e y f). El microcallo friable pudo ser diferenciado del callo nodular por la permanencia del coleóptilo y la raíz principal del explante (Figura 2.3 g y 2.4 a).

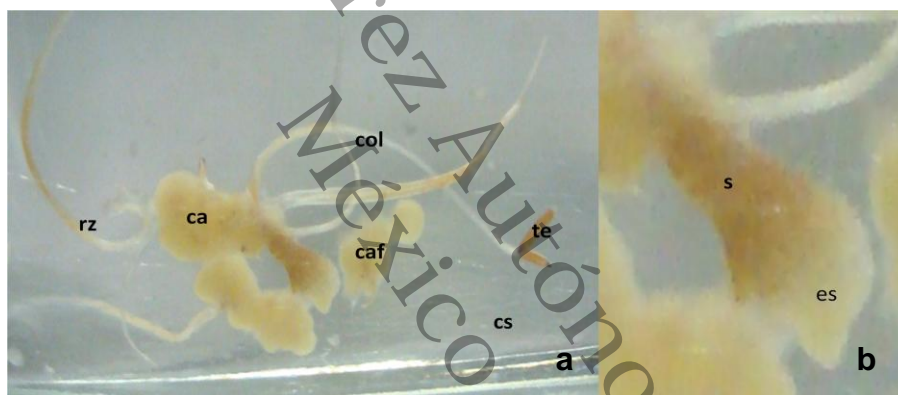


Figura 2.4. Embrión somático sobre callo amarillo nodular. (a): Embrión somático sobre callo amarillo. (b): Detalle de embrión somático. rz: raíz. ca: callo amarillo nodular. caf: callo amarillo friable. col: coleoptilo persistente. te: testa. cs: células suspendidas. s: suspensor. es: embrión somático. (a) =16x

La cinética de desarrollo de las estructuras y morfologías celulares derivadas del explante proporcionaron datos cuantitativos sobre la eficiencia de la embriogénesis somática. El abultamiento del explante se observó a los 14 días, pero alcanzó en 21 días el porcentaje más alto en los cultivos que estuvieron expuestos a 2,4-D en 0.5 y 2 mg·L⁻¹, con luz y en oscuridad (Figura 2.5). En el abultamiento se desarrollaron el callo amarillo y el callo blanco a los 21 y 28 días, respectivamente (Figura 2.5).

En la producción de callo amarillo nodular sobresalió por su elevado porcentaje las concentraciones de 0.5 y 1 mg·L⁻¹ de 2,4-D y presentó un máximo incremento entre los 44 y 58 días (Figura 2.5). Los cultivos con mayor porcentaje de callo blanco fueron los de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D en ambos ambientes y su nivel de producción no varió desde los 28 días. Los porcentajes con callo blanco fueron relativamente muy bajos respecto a los de callo amarillo (Figura 2.5).

En secuencia a los 44 días, el 50% de los tratamientos mostraron embriones somáticos. En los siguientes 15 días destacó la producción de embriones del 40% en 2 mg·L⁻¹ de 2,4-D en oscuridad. El callo amarillo nodular y el embrión somático presentaron obscurecimiento. En ambos casos el obscurecimiento que se tuvo a partir del día 28 alcanzó su valor máximo al día 44 en el 37.17% de los cultivos.

En la tabla 2.2 se indican los tiempos seleccionados de cada variable y las diferencias significativas que presentaron las diferentes concentraciones de 2,4-D sobre el abultamiento y la formación de callos en el explante. El efecto de la concentración de 2,4-D y el tipo de ambiente en los tiempos de cultivos de *T. domingensis* con máximos porcentajes de respuestas *in vitro* sobre el explante y el medio de cultivo fue significativo con 2,4-D y se presentó en las variables de abultamiento y callo amarillo sobre el explante ($p < 0.05$).

El abultamiento de la base caulinar fue superior en la concentración 0.5 mg·L⁻¹ respecto a los cultivos que presentaron 2.0 mg·L⁻¹ y fue similar a 1 mg·L⁻¹. En las concentraciones de 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D también superior el porcentaje de cultivos con callo amarillo. El embrión somático no registró diferencias significativas en las concentraciones de 2,4-D y condiciones de cultivo ensayadas ($p > 0.05$).

En el análisis cinético de embriogénesis sobre el medio de cultivo los microcallos friables amarillos y oscuros fueron registrados entre la tercera y quinta semana de evaluación (Figura 2.7). En las comparaciones entre los tiempos de máxima

producción, el 2,4-D y el ambiente de cultivo no afectaron la formación de microcallos friables, células suspendidas y turbidez ($p > 0.05$), (Tabla 2.1).

Perfiles similares en el tiempo de formación de las estructuras embriogénicas y no embriogénicas del explante y generadas en el medio se observaron en relación a los registros de callo friable, células suspendidas y la condición de turbidez del medio de cultivo (Figura 2.5 y 2.6). Los microcallos o callos amarillos friables se formaron entre los días 14 y 21 en 2 y 1 mg·L⁻¹ de 2,4-D, respectivamente, aunque su producción máxima la alcanzó el día 28 en 25.53% de los cultivos (Figura 2.6).

La respuesta más sobresaliente fue la formación de células suspendidas las cuales se observaron como múltiples estructuras diminutas solo observables a contra luz. En el medio de cultivo las células suspendidas fueron visibles a partir del séptimo día en la concentración de 2.0 mg·L⁻¹ de 2,4-D en oscuridad y el día 14 en las de 1.0 y 2.0 mg·L⁻¹ de 2,4-D, con luz. El promedio de cultivos con células suspendidas fue mayor de 80 % en presencia de luz y con 0.5 mg·L⁻¹ de 2,4-D entre los días 51 y 58 (Figura 2.6).

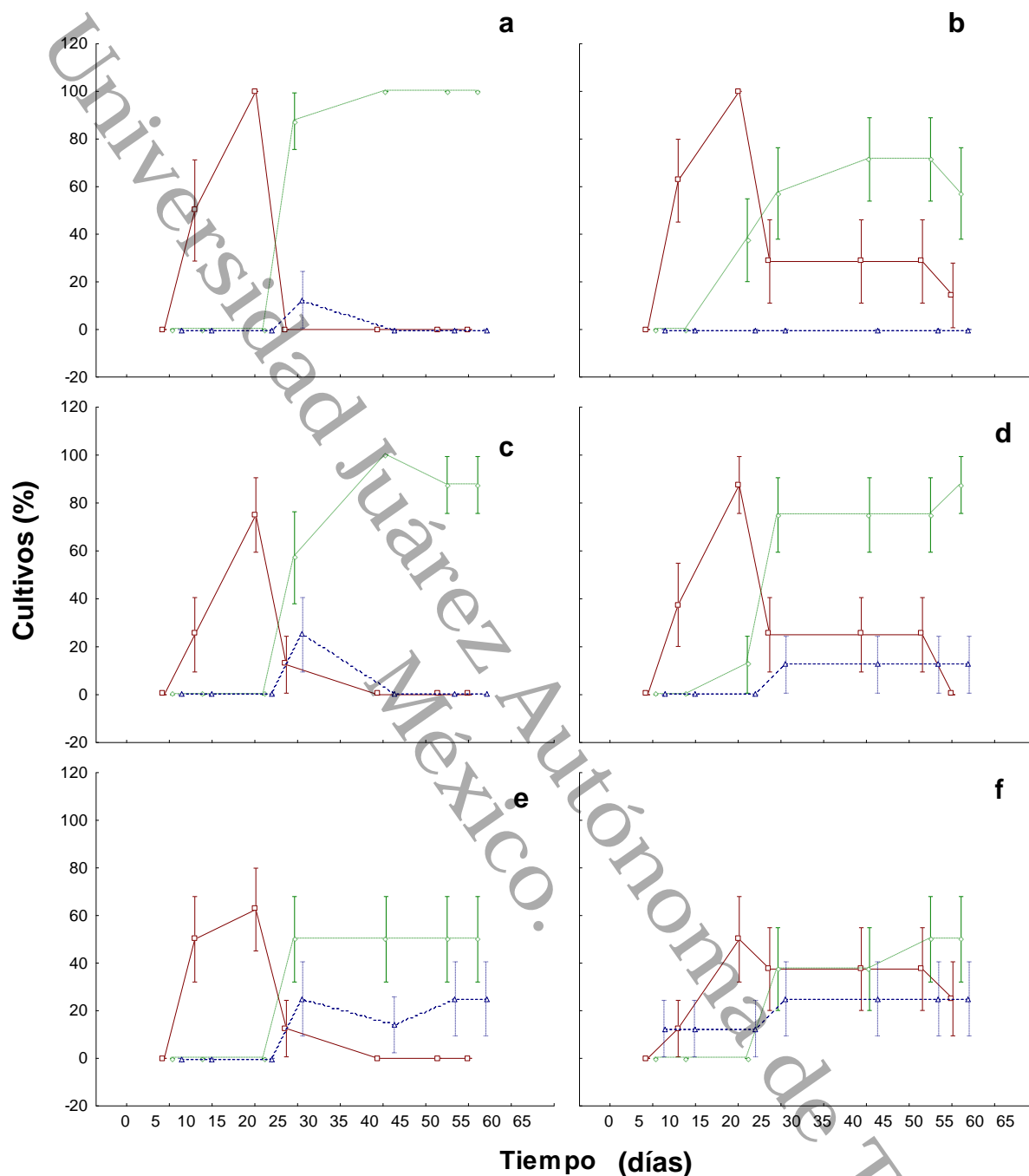


Figura 2.5. Cinética de callo amarillo, callo blanco y embrión somático sobre el explante con factores combinados 2,4-D ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y ambiente: a) 0.5 +L, b) 0.5 +O, c) 1.0 +L, d) 1.0 +O, e) 2.0 +L, f) 2.0 +O. L = Luz y O= Oscuridad. Línea sólida con cuadrados = abultamiento, línea discontinua con rombos = callo amarillo, línea punteada con triángulos = callo blanco. Líneas verticales = promedios \pm error estándar.

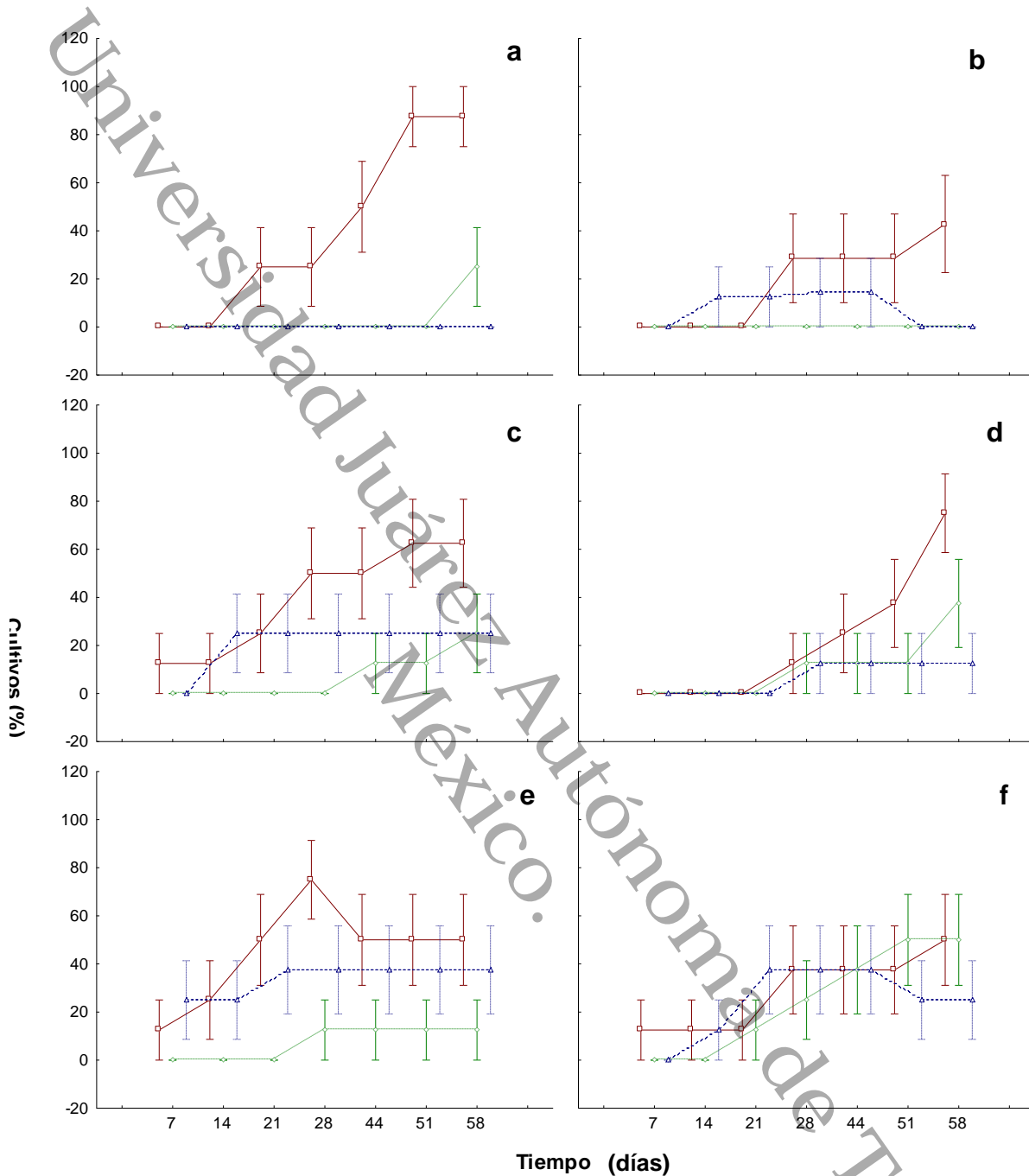


Figura 2.6 Cinética en la formación de las células suspendidas, callo amarillo friable y turbidez en el medio de cultivo de *Typha domingensis* con factores combinados 2,4-D ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y ambiente: a) 0.5 +L, b) 0.5 +O, c) 1.0 +L, d) 1.0 +O, e) 2.0 +L, f) 2.0 +O. L = Luz y O= Oscuridad. Línea punteada con triángulos = turbidez, línea sólida con cuadrados = células suspendidas, línea discontinua con rombos = callo friable. Líneas verticales = promedios \pm error estándar.

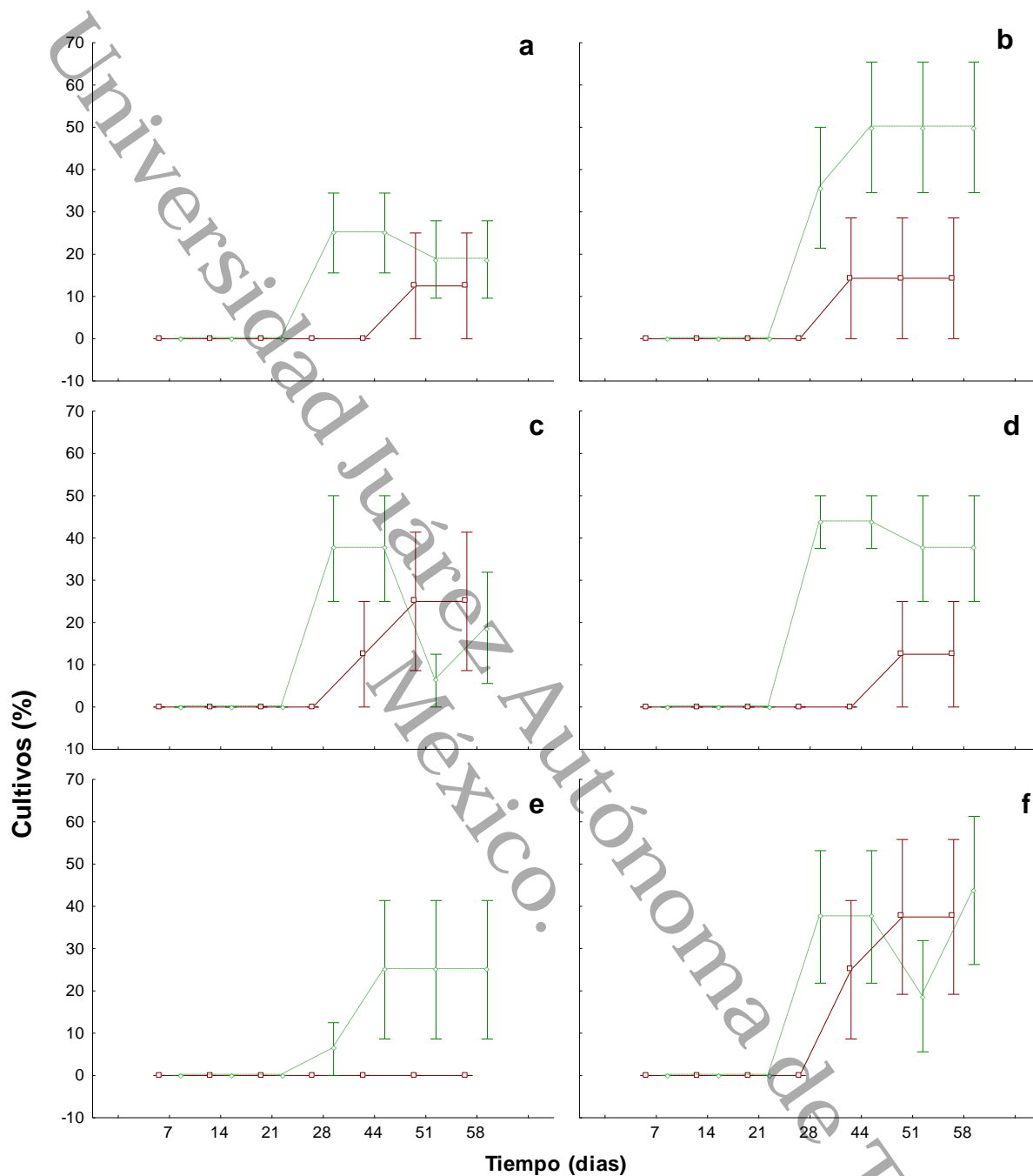


Figura 2.7 Grado de necrosis de los embriones somáticos formados en los cultivos de *Typha domingensis* expuestos en combinación de 2,4-D ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y tipo de ambiente: a) 0.5 +L, b) 0.5 +O, c) 1.0 +L, d) 1.0 +O, e) 2.0 +L, f) 2.0 +O. L = Luz y O= Oscuridad. Línea sólida con cuadrados = embrión somático, línea discontinua con rombos = necrosis. Líneas verticales = promedios \pm error estándar.

En algunos casos el medio también presentó un aspecto blanquecino (Figura 2.5 f) que se denominó turbidez. La turbidez del medio de cultivo se registró a partir del día siete en el tratamiento 2,4-D 2 mg·L⁻¹ de en un ambiente con luz y hasta los 28 días en el tratamiento 2,4-D 1 mg·L⁻¹ de en ausencia de luz. El aumento de números de cultivos con turbidez se mantuvo asociado al incremento en la concentración de 2,4-D.

Con el conjunto de todos estos resultados se identificaron las condiciones para mejorar la embriogénesis somática de *T. domingensis* distinguiendo las etapas críticas que detonaron el proceso progresivo del embrión somático, inducción, expresión embriogénica y maduración del embrión somático, las cuales definieron la segunda fase experimental. El mapa destino de las morfologías celulares del explante en función de la concentración de 2,4-D y el ambiente de cultivo en luz y oscuridad se muestra en la Figura 2.8.

En la etapa de maduración, el necrosamiento del callo amarillo nodular, microcallo y el embrión somático persistió y sin haber reportado diferencias respecto a la de inducción embriogénica.

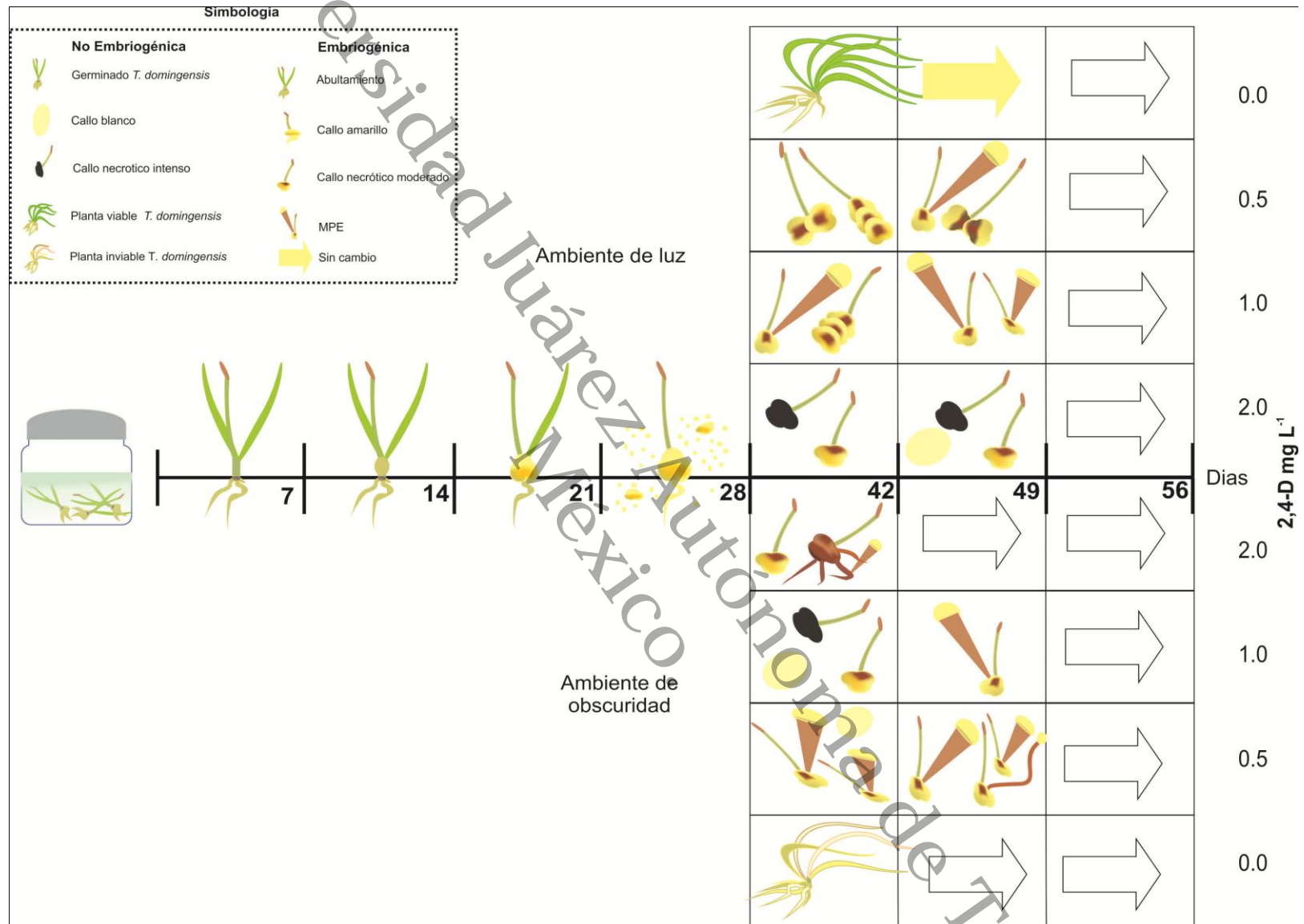


Figura 2.8. Mapa destino que ilustra la morfología *in vitro* de *Typha domingensis* a 56 días con diferentes concentraciones de 2,4-D en ambientes de luz y oscuridad.

Tabla 2.1.- MANOVA Variación estadística en las respuestas embriogénicas de *T. domingensis* en tiempos de máxima producción. Interacción = Luz/Oscuridad x 2,4-D.

Nivel	Variable dependiente	Factor	Parámetros estadísticos				
			SS	MS	F	P	
Explante	Abultamiento	Luz/Oscuridad	0.00	0.00	0.00	1.00	
		2,4-D	15416.67	7708.33	5.18	0.01	
		Interacción	1250.00	625.00	0.42	0.66	
	Callo amarillo nodular	Luz/Oscuridad	5685.22	5685.22	3.43	0.07	
		2,4-D	19421.67	9710.84	5.85	0.01	
		Interacción	558.04	279.02	0.17	0.85	
	Callo necrótico	Luz/Oscuridad	2492.73	2492.73	1.87	0.18	
		2,4-D	727.98	363.99	0.27	0.76	
		Interacción	699.57	349.79	0.26	0.77	
	Callo blanco	Luz/Oscuridad	813.95	813.95	0.53	0.47	
		2,4-D	2798.30	1399.15	0.92	0.41	
		Interacción	411.93	205.97	0.14	0.87	
	Embrión somático	Luz/Oscuridad	934.39	934.39	0.64	0.43	
		2,4-D	292.21	146.10	0.10	0.90	
		Interacción	5292.21	2646.10	1.81	0.18	
	Medio de cultivo	Callo amarillo friable	Luz/Oscuridad	813.95	813.95	0.43	0.52
			2,4-D	3579.55	1789.77	0.95	0.40
			Interacción	7613.64	3806.82	2.01	0.15
Células suspendidas		Luz/Oscuridad	1345.51	1345.51	0.55	0.46	
		2,4-D	3155.44	1577.72	0.65	0.53	
		Interacción	6905.44	3452.72	1.42	0.25	
Turbidez		Luz/Oscuridad	4.15	4.15	0.00	0.96	
		2,4-D	7295.05	3647.52	2.14	0.13	
		Interacción	1385.96	692.98	0.41	0.67	

Tabla 2.2 Porcentajes de cultivo con las estructuras embriogénicas sobre el explante y el medio de cultivo.

Nivel	Variable dependiente	Tmax	2,4-D (mg·L ⁻¹)		
			0.5	1	2
Explante	Abultamiento	21	100 ^a	81.85 ^{ab}	56.25 ^b
	Callo blanco	28	6.66	18.75	25.00
	Callo amarillo nodular	44	86.66 ^a	87.50 ^a	43.75 ^b
	Callo necrótico	44	36.66	40.62	56.25
	Embrion somático	51	13.33	18.75	56.25
Medio de cultivo	Friabilidad	58	13.33	31.25	31.25
	Turbidez	28	6.66 ^b	18.75 ^{ab}	37.50 ^a
	Células suspendidas	58	66.66	68.75	50

Promedios con literales iguales no fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$). Tmax= Tiempo de máxima producción en días.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Discusión

La eficiencia germinativa de $60\pm 10\%$ en las semillas de *T. domingensis* en almacenamiento prolongado fue inferior al reportado por Lorenzen *et al.* (2000) quien en esta misma especie presentó una eficiencia de 85%. Así como en otras especies como *T. sabulata* y *T.a latifolia* que han registrado más de 84% de germinación (Sobrero *et al.* 1993, Rogers 2003). Este género ha demostrado viabilidad en sus semillas aun después de un almacenamiento superior a los 12 meses (Lorenzen *et al.* 2000; Sobrero *et al.* 1993).

Los germinados *in vitro* de *T. domingensis* demostraron ser una buena fuente de explante al no presentar contaminación y ser de fácil manipulación. Lo anterior concuerda con Rogers (2003) y Rogers *et al.* (1998) que destacaron las ventajas del empleo de germinados *in vitro* de *T. latifolia* en el desarrollo de protocolos de regeneración eficientes.

Evaluación morfológica de la embriogénesis somática

En el explante de *T. domingensis* y el medio de cultivo se revelaron estructuras celulares ampliamente descritas por la literatura como precursoras del embrión somático (Quiroz-Figueroa *et al.* 2006; Fehér *et al.* 2003; Dodeman *et al.* 1997). El abultamiento sobre la conexión hoja-raíz que en el germinado de *T. domingensis* corresponde a la sección del hipocótilo y la funda cotiledonar fue la señal primaria del efecto embriogénico del 2,4-D. Otras plantas acuáticas como *T. latifolia*, *Cymodosea nodosa* y *V. americana* (Álvarez 2007; Pérez *et al.* 2007; Rogers 2003; Rogers *et al.* 1998) han reportado respuestas similares referente al sitio de acción para este tipo de explante. El abultamiento ha sido descrito como una etapa previa a la formación de callo debido a que el sitio presenta características fisiológicas y anatómicas que influyen en el desarrollo de la planta. Desde el punto de vista estructural el hipocótilo y el hipérfilo cotiledonar pertenecen a un complejo órgano de almacenamiento del embrión, el cotiledón (Tillich 2007), y ambos abrazan una zona meristemática perteneciente al brote apical del germinado que es la fuente de auxina endógena (Fehér *et al.* 2003). En monocotiledóneas este brote se conoce como plúmula (Tillich 2007).

A consecuencia, de este abultamiento se derivó el callo amarillo nodular. La exposición de explantes al 2,4-D y a otros factores condicionantes de la embriogénesis somática como el ambiente y la composición del medio inducen rediferenciación celular y proliferación embriogénica (Von Arnold 2008; Quiroz-Figueroa *et al.* 2006; Fehér *et al.* 2003). El callo de *T. domingensis* fue similar a las descripciones morfológicas y de coloración descritas en germinados de las plantas acuáticas *T. latifolia*, *T. angustifolia* (Nandakumar *et al.* 2005; Rogers 2003; Rogers *et al.* 1998), *V. americana* (Álvarez 2007) y *Cimodoseae nodosa* (Pérez *et al.* 2007), embriones cigótico de *Oryza sativa* (Menesses *et al.* 2005; Mariani *et al.* 2002) e inflorescencias de *P. australis* (Lauzer *et al.* 2000) y *Panicum virgatum* (Burriss *et al.* 2009). La coloración amarilla del callo en *T. domingensis* indicó su carácter embriogénico, pero fue concluyente cuando del callo amarillo formado sobre el explante se originaron embriones somáticos.

Los callos de *T. domingensis* presentaron necrosis moderada a severa al finalizar el experimento de inducción embriogénica, sin embargo la mayoría de los callos registraron carácter embriogénico. El necrosamiento progresivo de las estructuras celulares embriogénicas fue adjudicado al estrés oxidativo que provocó el envejecimiento del cultivo (Benson 2000). No obstante varios autores han notificado que el tejido café o necrótico no es necesariamente perjudicial en la morfogénesis, inclusive se ha observado la formación de embriones somático alrededor de las áreas necrosadas, señalando que esta característica puede ser esencial para la iniciación de la embriogénesis (George & Davies 2008). En plantas terrestres como *Coffea arabica* el callo embriogénico se ha reportado café (fenolizado) (Quiroz-Figueroa *et al.* 2006) mientras que en *Theobroma cacao* esta característica inhibe la embriogénesis considerándose una especie recalcitrante (Alemanno *et al.* 2003).

El callo blanco y los microcallos suspendidos de *T. domingensis* no presentaron potencial embriogénico u organogénico. En *P. australis* el callo blanco se ha reportado como no embriogénico y se caracterizó por su superficie viscosa (Lauzer *et al.* 2000) pero en otros como *P. virgatum* este tipo de callo, denominado

tipo II, fue ideal para iniciar cultivos de suspensiones celulares al ser altamente friables, de rápido crecimiento y sumamente regenerativo (Burriss *et al.* 2009). En *N. cristatum* los dos tipos de callos blanco y amarillo formaron embriones somáticos, solo que en el callo blanco se produjeron tardíamente y después de varios subcultivos (Niranjan *et al.* 2008). No se descarta la posibilidad que en *T. domingensis* el callo blanco evolucione a la condición embriogénica en otras condiciones experimentales.

La morfogénesis de los embriones somáticos de *T. domingensis* fue similar a la reportada en otras plantas acuáticas emergentes como *Oryza sativa* (Vega *et al.* 2009; Menesses *et al.* 2005; Mariani *et al.* 2002), *T. latifolia* (Rogers 2003), *P. communis* (Yang *et al.* 2003), *P. australis* (Máthé *et al.* 2000) y especies terrestre *P. abies* (Filonova *et al.* 2000), *Cocus nucifera* (Azpeitia *et al.* 2009), *Phoenix dactilifera* (Sané *et al.* 2006). Lo anterior, porque la morfogénesis de embriones somáticos puede ocurrir por diferentes vías de desarrollo (Von Arnold 2008; Quiroz-Figueroa *et al.* 2006; Dodeman *et al.* 1997). La embriogénesis somática no es del todo clara, la hipótesis señala que la vía de desarrollo directa se obtiene de células embriogénicamente predeterminadas mientras que la vía indirecta surge a partir de células indiferenciadas generalmente un callo (Von Arnold 2009). Los germinados de *T. domingensis* desarrollaron el callo y de él derivó el embrión somático. Al parecer esta vía ha sido la más recurrente en otras monocotiledóneas como *O. sativa*, *T. domingensis*, *P. australis* y *C. nuciferas* (Vega *et al.* 2009; Rogers 2003; Máthé *et al.* 2000; Azpeitia *et al.* 2009). Aunque la embriogénesis somática directa se ha observado en el embrión cigótico de *Oryza sativa* (Mariani *et al.* 2002) y *Daucus carota* (Nishiwaki *et al.* 2000). Otra vía de la embriogénesis somática corresponde a su origen unicelular o multicelular. La última se origina a partir de agregados de células simétricas o asimétricas denominados masas proembriogénicas, solamente diferenciadas por la presencia del suspensor cuando proviene de una sola célula (Quiroz-Figueroa *et al.* 2006; Dodeman *et al.* 1997). *T. domingensis* presentó una estructura tipo suspensor. Esta estructura también se ha relacionado con el grado de desarrollo del embrión somático, por lo que esta vía unicelular se haya expresado en *T. domingensis*, pero para aseverar esta

interpretación hacen falta estudios histológicos que lo confirmen (Rugkhla & Jones 1998).

Efecto del factor auxina-ambiente en la competencia embriogénica de *Typha domingensis*

La producción de callo embriogénico y algunas fases tempranas de formación del embrión somático en la especie *T. domingensis* fueron favorecidas por las tres concentraciones de 2,4-D ensayadas, en ausencia y presencia de luz. Aunque el 2,4-D fue el único factor que controló significativamente ($p < 0.05$) la formación del callo embriogénico en *T. domingensis*.

Dentro del género *Typha*, las especies *T. latifolia* y *T. domingensis* han sido de las más estudiada para fines de propagación y transformación genética y en las investigaciones se han reportado numerosas respuestas callogénicas. Rogers *et al.* (1998) y Nandakumar *et al.* (2005) produjeron callo organogénico en germinados de *T. latifolia* en concentraciones 5 mg L^{-1} de 2,4-D a los 8 y 25 días respectivamente, mientras que Czakó *et al.* (2006) obtuvo callo organogénico y embriogénico en inflorescencias de esta misma especie en concentraciones diez veces menor de auxina. El último caso es similar a *T. domingensis* quien presentó callogénesis en el 80% de los cultivos en concentraciones bajas de auxina. Lauzer *et al.* (2000) también obtuvo callogénesis en *P. australis* en 1, 2 y 4 mg L^{-1} de 2, 4-D a partir de inflorescencias inmaduras no obstante su mejor producción de callo embriogénico fue 4.5 veces menor y requirió el doble de la concentración de 2,4-D que indujo la misma respuesta en nuestra especie. Sin embargo la respuesta callogénica de *P. australis* fue tres veces menor que la reportada en *T. domingensis*.

Al igual que en *P. australis*, *O. sativa*, *P. virgatum* y *C. nucifera* en la superficie del callo amarillo de *T. domingensis* derivaron los embriones somáticos (Burriss 2009; Vega *et al.* 2009; Menneses *et al.* 2005; Azpeitia *et al.* 2003; Lauzer *et al.* 2000). El estado de desarrollo del embrión somático fue morfológicamente equiparable a las

estructuras descritas en varias especies. Los embriones somáticos de *T. domingensis* presentaron estructuralmente una masa embrional y suspensor muy similar al encontrado en el embrión somático temprano en la gimnosperma *P. abies* (Von Arnold 2008). En la monocotiledónea *O. sativa* la estructura tipo suspensor fue distinguida en el embrión somático en elongación (Vega 2009). La presencia del suspensor fue clave para dictaminar no solo el origen del embrión sino su estado de desarrollo. En las gimnospermas la embriogénesis temprana incluye las fases posteriores en que el suspensor comienza a elongar hasta el establecimiento de la radícula, mientras que en angiospermas son etapas de transición a la fase cotiledonar que es la esta estructura temporal en el desarrollo al promover el continuo crecimiento del propio embrión (Von Arnold 2008). Tanto en *P. abies* como en *O. sativa* esta diferenciación se da en un medio libre de auxina y en algunos casos solo se reduce la concentración de 2,4-D. El tiempo entre la aparición del embrión somático y fases sucesivas de desarrollo es corto (Von Arnold 2008; Vega *et al.* 2009; Mariani *et al.* 2002). En el caso de *T. domingensis* la aparición del embrión somático sucedió mas tarde en presencia de 2,4-D.

Aunque la presencia de callo blanco fue relativamente baja en *T. domingensis*, se observó una tendencia correlativa entre los porcentajes de callo blanco, friabilidad y turbidez. En *P. virgatum* (Burris 2009) y *Musa sp* (Strosse *et al.* 2003) estas estructuras descritas como translúcidas y suaves representan una forma de callo sumamente quebradizo o friable denominado tipo II o ideal y es considerado excelentes para iniciar suspensiones celulares.

La ausencia y presencia de luz no ha sido determinante en la expresión embriogénica del explante. En las especie acuáticas *O. sativa* (Mariani *et al.* 2002; Nandakumar *et al.* 2005), *T. latifolia* (Rogers *et al.* 1998), *P. virgatum* (Burris, 2009), *B. schreberi* (Oh *et al.* 2008) y la terrestre *P. abies* (Filonova *et al.* 2000) la condición de oscuridad produjo callo embriogénico, mientras que en *N. cristatum* (Niranjan *et al.* 2008) y *P. australis* (Máthé *et al.* 2000) en presencia de luz

indujeron la respuesta embriogénica. No obstante *T. domingensis* produjo todas sus estructuras embriogénicas tanto en luz como en oscuridad. Aun cuando la producción de callo embriogénico y embrión somático evolucionaron morfológicamente de forma similar en presencia y ausencia de luz, no se descarta la trascendencia que puede representar el estímulo de la luz para guiar el proceso metabólico hacia una embriogénesis somática exitosa. La división, elongación, polaridad y diferenciación celular son respuestas desencadenadas por una variedad de señales no solo hormonales sino también ambientales, como la luz (Dodeman *et al.* 1997; Roca & Mroginski 1991).

Los trabajos sobre embriogénesis somática han proporcionado una serie de conceptos relacionados al desarrollo de estructuras morfológicas que conducen a la obtención del embrión somático. Estos conceptos han sido resultados de estudios cualitativos basados en la apariencia de los desarrollos morfológicos. El tamaño, color, forma y otras características visuales de los callos y embriones somáticos de *T. domingensis* permitieron establecer el mapa de la vía embriogénica pero deben ser confirmados con estudios histológicos y metabólicos.

Proceso multietapas de embriogénesis somática en *Typha domingensis*

Resumen

La alternativa biotecnológica de propagación por embriogénesis somática es ideal para las aplicaciones inmediatas de repoblación y conservación de germoplasma de *T. domingensis*. Con este propósito se diseñaron las etapas de inducción embriogénica (etapa 0), proliferación (etapa I) y de maduración del embrión somático (etapa II) con evaluaciones de 28 días por etapa. El medio de cultivo fue MS_{0.5} suplementado con 10 mg·L⁻¹ de ácido ascórbico y 3% de sacarosa. La inducción embriogénica se estableció en oscuridad y 0.5 mg·L⁻¹ de 2,4-D en explantes de germinados *in vitro*. El efecto 0.5, 1 y 2 mg·L⁻¹ de 2,4-D fue evaluado en oscuridad en la segunda etapa. En la última etapa fue el ambiente de luz y oscuridad sin 2,4-D. Las estructuras morfológicas embriogénicas y no embriogénicas fueron descritas y cuantificadas en todas las etapas. El 2,4-D tuvo efecto significativo en la formación de callo amarillo, café y en las células suspendidas. Los embriones somáticos se registraron en todas las etapas predominando el tipo oblongo más que el cotiledonar. El cultivo de embriones somáticos fue de baja eficiencia y asincrónico. El mapa destino y el acercamiento al modelo básico de embriogénesis somática indirecta de *T. domingensis* son descritos. Otras vías embriogénicas y organogénicas fueron prometedoras para masificar embriones somáticos de esta hidrófita emergente en riesgo de declinación como consecuencia de un estrés ambiental múltiple o por la amenaza de sobreexplotación.

Introducción

La destrucción de humedales en el último siglo aunado al cambio climático sitúa a estos entre los de mayor riesgo de desaparición en el planeta (Erwin 2009; Touchette & Steudler 2009; Hersner & Havens 2008; Nicholls 2004) y la función ecológica e integridad de estos ecosistemas así como la disponibilidad y diversificación de recursos económicamente y potencialmente valiosos se ve comprometida. Entre la vegetación acuática que sustenta estos ecosistemas destacan las plantas emergentes siendo *Typha domingensis* la más común y abundante en los humedales de Norte y Centro América (Rzedowski & Rzedowski 2005).

Typha domingensis se emplea en la construcción de humedales artificiales, como especie de ornato y recurso alimenticio (Arenas & Escarpa 2003; Stevens & Hoag 2000). Un enfoque reciente es su aprovechamiento potencial en la industria energética como fuente de biocombustible (Hernández-Piedra 2009; Suda *et al.* 2009) entre otros subproductos. Por lo tanto es necesario impulsar estudios que permitan entender procesos básicos reproductivos de *T. domingensis*, ya que es una especie emergente abundante con riesgo de pérdida o declinación en sus poblaciones como consecuencia de un estrés múltiple producto del trinomio cambio climático - contaminación – cultivo potencial.

La embriogénesis somática es un sistema modelo para estudios embriológicos, principalmente por su factibilidad, rápida respuesta y alta productividad (Von Arnold 2008; Quiroz-Figueroa *et al.* 2006; Fehér *et al.* 2003). Aunque la embriogénesis somática se ha estudiado en diferentes especies modelo estas no son comparables (Dodeman *et al.* 1997). El desarrollo de esta técnica en secuencia multietapas proporciona detalles y precisión para comprender el proceso de embriogénesis somática y enfocarlo a aplicaciones inmediatas con perspectiva ambiental o tecnológica. Dependiendo del objetivo y la especie la secuencia de etapas para la obtención de embriones somáticos puede variar, por

ejemplo en las gimnospermas la regeneración de plantas vía embriogénesis somática incluye cinco etapas (Von Arnold 2008).

La embriogénesis somática se fundamenta en el uso de fitorreguladores sintéticos, principalmente auxinas que permiten la activación simultánea de señales que inducen la reprogramación celular, lo que da como resultado la competencia embriogénica (Fehér *et al.* 2003). Gracias a los recientes avances en mecanismos moleculares de transporte y señales de auxina se ha descubierto su rol fundamental en las fases tempranas del desarrollo de la planta como es el desarrollo del eje apical-basal (yema-raíz) del embrión, así como en la formación del meristemo apical del brote y raíz y los propios cotiledones (Jenik & Barton 2005). El 2,4-D es una fitohormona de efecto dual por su función propia como auxina y como estresor detonante de la inducción y expresión de la embriogénesis somática (Fehér *et al.* 2003; Jiménez 2001). La composición del medio y la luz, son otros factores que regulan el proceso de embriogénesis ya que estos elementos pueden controlar la división celular, elongación, polaridad y diferenciación (Quiroz-Figueroa *et al.* 2006; Dodeman *et al.* 1997; Roca & Mroginski 1991).

En *T. domingensis* es necesario la optimización del sistema de embriogénesis somática el cual depende en gran medida del esclarecimiento de los requerimientos ambientales y nutricionales necesarios para la especie en diferentes etapas de cultivo. El objetivo de esta investigación fue determinar la condición experimental que favorece la vía de desarrollo del embrión somático y modelar eficientemente el proceso básico de embriogénesis somática de *T. domingensis* en una secuencia de tres etapas.

Método

El procedimiento metodológico general para desarrollar el protocolo de embriogénesis de *Typha domingensis* optimizado en secuencia multietapas se ilustra en el Anexo. Las plántulas de *Typha domingensis* se establecieron de cultivos *in vitro* iniciados de semillas. El origen, procedimiento de asepsia y las condiciones de germinación fueron similares a las citadas en el capítulo anterior. La plántula de nueve días fue el explante para establecer el método optimizado de embriogénesis somática. El método incluyó etapas experimentales separadas, de inducción embriogénica, formación y multiplicación de embriones y de maduración del embrión somático (Figura 3.1).

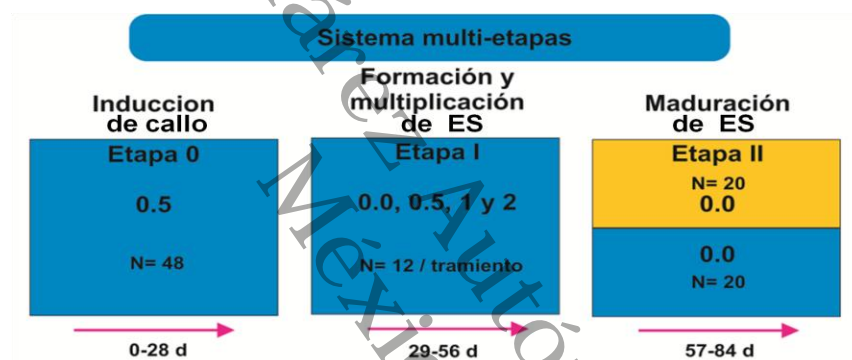


Figura 3.1. Secuencia multietapas del proceso embriogénico de *T. domingensis*. Código de colores: ambiente oscuro ■ y ambiente con luz ■. Tiempo en días entre cada subcultivo (➔). ES= embrión somático.

En las tres etapas el medio de cultivo fue MS (Murashige & Skoog 1962) con la mitad de la fuerza iónica ($MS_{0.5}$) y suplementado con sacarosa 3% y $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido ascórbico. El ácido ascórbico se agregó como antioxidante para disminuir el elevado necrosamiento reportado previamente en los cultivos (Capítulo 1). El medio de cultivo fue esterilizado en autoclave a 121°C y 104 kPa durante 25 min. Las unidades de cultivo con tres plántulas cada una fueron incubadas a $25 \pm 5^\circ \text{C}$ y en agitación (125 rpm). Los cultivos expuestos a condiciones de luz recibieron $20 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y fotoperiodo de 16:8 h luz: oscuridad. Los cultivos en oscuridad se mantuvieron en cajas de cartón cerradas. El proceso optimizado de

embriogénesis inició con 48 unidades de cultivo, de las cuales 48 continuaron en la etapa I y 40 en la etapa II. Las transferencias de todos los productos de cultivo, embriogénicos o no embriogénicos (de estructuras adheridas al explante y dispersas en el medio de cultivo) a medio de cultivo renovado en las etapas sucesivas se realizaron manualmente. Las transferencias fueron de 28 días cada una.

En la etapa 0, los estados tempranos de la embriogénesis somática se identificaron con 2,4-D $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en ambiente obscuro. La concentración 2,4-D fue fijada para alcanzar su máximo abultamiento de explantes y masificar la producción de callo embriogénico, conforme a resultados anteriores (Capítulo 1).

En las etapas siguientes se establecieron experimentos para propiciar el desarrollo y masificación de los estados tardíos del embrión somático. En ambas etapas el arreglo experimental fue unifactorial.

En la etapa I, la variación de la concentración 2,4-D fue evaluada en concentraciones de 0.0, 0.5, 1.0 y $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D en $\text{MS}_{0.5}$. Cada condición experimental fue establecida con 12 réplicas experimentales. La condición ambiental se manejó en completa oscuridad.

En la etapa II, se analizó la variación del factor ambiente del cultivo en niveles de luz y oscuridad. El 2,4-D se eliminó del medio de cultivo ya que el experimento fue dirigido a lograr la maduración del embrión somático.

Los detalles morfológicos de todas las estructuras embriogénicas u organogénicas se analizaron en un microscopio estereoscopio Zeiss Stemi DVA (8x-32x). Las diferentes morfologías se clasificaron por la ubicación, sobre el explante o disperso en el medio de cultivo.

Los datos registrados estimados en el explante fueron el porcentaje con abultamiento, callo amarillo nodular (adherido). También fueron registrados el porcentaje de cultivos con callo amarillo friable, callo blanco y células suspendidas.

En las etapas I y II fueron registrados todos los datos de la etapa 0, excepto el abultamiento, más los estados de desarrollo embriogénico tardío que fue el embrión somático. La morfología de los callos y embriones somáticos en sus diferentes estadios de desarrollo fueron determinadas de acuerdo a revisiones de Von Arnold (2008), Quiroz-Figueroa *et al.* (2006), Feher *et al.* (2003) y Dodeman *et al.* (1997). La regeneración directa o indirecta de hoja y/o raíz o cualquier señal de necrosis en las estructuras citadas fue caracterizada y cuantificada en todos los casos.

Análisis estadístico

Los datos de las Etapas I y II fueron analizados para verificar el cumplimiento o incumplimiento de las hipótesis de contraste de la normalidad y homocedasticidad. Según el caso, las variables cuantitativas fueron comparadas mediante ANOVAS paramétrico y no paramétrico complementadas con el contraste de medias de Fisher y Kruskal-Wallis. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

Resultados

En la primera etapa embriogénica (Etapa 0) de *Typha domingensis* destacó el abultamiento de la base caulinar en el explante en el 100% de los cultivos y la formación del callo amarillo en el 73.44% y de callo café en el 30% con. El 50% de los cultivos presentaron células suspendidas. El total de embriones somáticos adheridos al explante y suspendidos en el medio de cultivo fue de 33.33% en esta etapa. Los embriones somáticos presentaron forma de cono y torpedo (Figura 3.2 b y c) y predominaron en el explante en porcentajes de 6.25%.

En la etapa I, el 2,4-D afectó significativamente la formación de callo amarillo y café sobre el explante y la producción de células suspendidas en el medio de cultivo (Tabla 3.1). Los porcentajes de explantes y/o cultivos de todas las respuestas de callos, embriones somáticos y células suspendidas se localizan en la Tabla 3.2. El porcentaje de explantes con callo amarillo fue comparable entre las concentraciones 0.5 a 2.0 mg·L⁻¹ de 2,4-D ($p < 0.05$) y fue nueve veces superior al callo café y cuatro veces a los callos amarillos suspendidos en el medio de cultivo.

Los callos cafés del explante presentaron mayor porcentaje comparados con los que se generaron en el medio de cultivo. La condición experimental sin fitorregulador mostró regeneración foliar indirecta de 52.77% por explante.

El callo café sobre el explante fue mayor en los cultivos sin 2,4-D en la etapa I. Con 2,4-D desarrolló un callo amarillo nodular en igual magnitud en las tres concentraciones. En el medio de cultivo, el 2,4-D no reflejó diferencias significativas.

En la producción de embriones somáticos totales el 2,4-D no provocó variación significativa (Tabla 3.1). El promedio total de embriones somático fluctuó entre 25 y 42%. Tampoco hubieron diferencias significativas entre el embrión somático

oblongo y cotiledonar formados adheridos al explante y los suspendidos (Tabla 3.2).

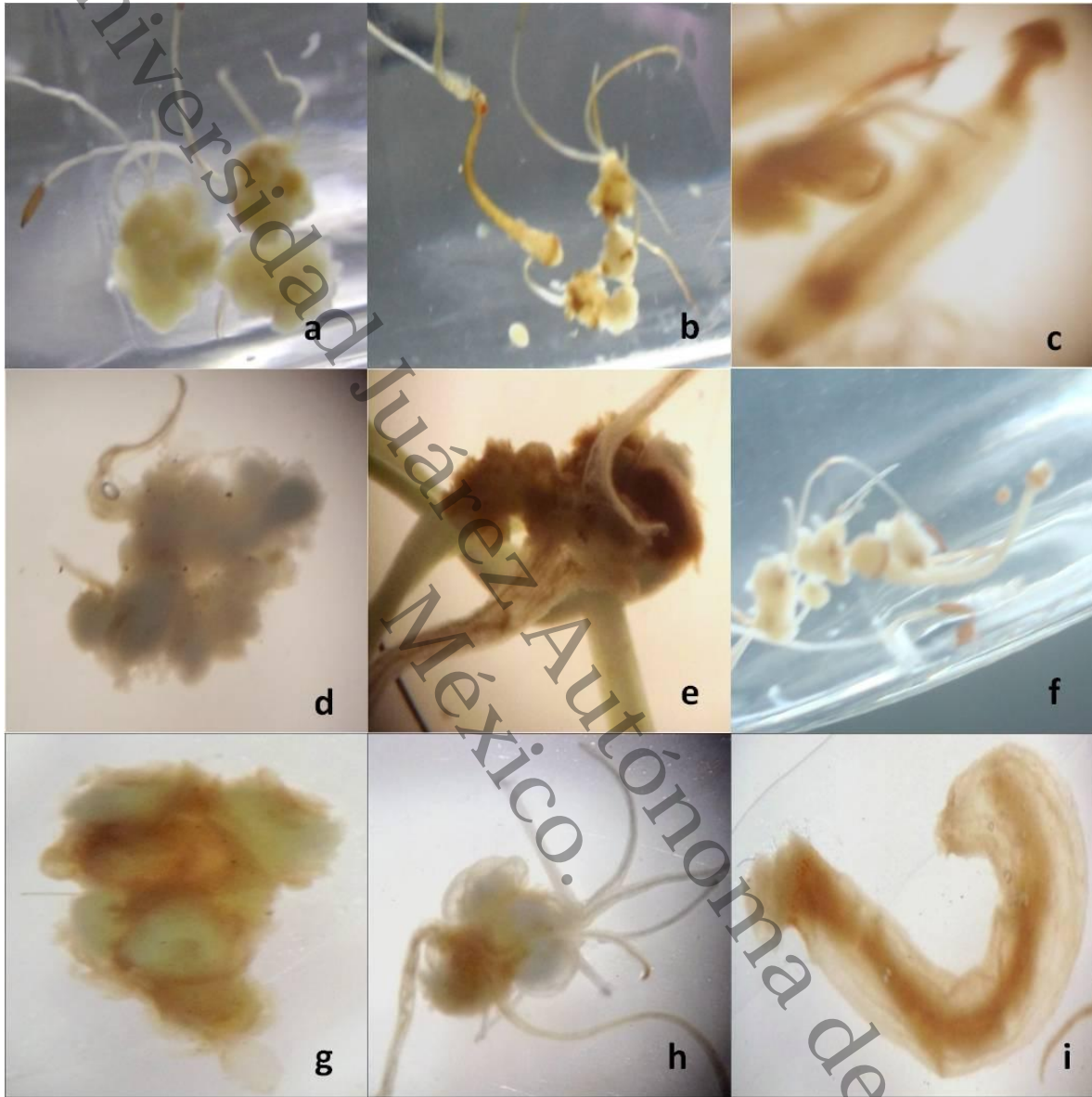


Figura 3.2 Características morfológicas durante la secuencia multietapa de *Typha domingensis* en la etapa 0 (a) (b) (c), en la etapa I (d) (e) (f), en la etapa II (g) (h) (i). (a): Callo amarillo nodular. (b): ES globular. (c): ES cotiledonar. (d): Callo amarillo. (e): Callo necrótico con regeneración de hoja. (f): Callos amarillos y ES globular. (g): Callo necrótico con brotes. (h): Callo amarillo con regeneración de raíz. (i): ES. ES: embrión somático. (a) (d) (e) (g) (h) =16x y (c) e (i) =32x.

Tabla 3.1 ANOVA paramétrico y no paramétrico de las respuestas celulares y embriogénicas de la etapa I con variaciones en la concentración de 2,4-D. (% de cultivos).

Sitio	Variable dependiente	Parámetros estadísticos					
		gl	SC	CM	H _(N=48)	F	P
Explante	Callo amarillo	3	45599.8	15199.9		12.358	0.0001
	Callo cafe	3	46649.83	15549.94		13.077	0.0001
	ES oblongo	3			4.523		0.210
	ES cotiledonar	3			3.849		0.278
Medio	Callo amarillo	3	4941.61	1647.20		1.076	0.369
	Callo cafe	3			3.000		0.391
	ES oblongo	3			3.562		0.312
	ES cotiledonar	3			6.127		0.105
	Células suspendidas	3	36018.7	12006.2		6.441	0.001
ES Total		3	2291.7	763.89		0.312	0.816

ES= embrión somático, Total= La suma de ES en el explante y medio de cultivo.

Tabla 3.2 Porcentajes de cultivo en las estructuras embriogénicas sobre el explante y el medio de cultivo en la etapa I con variaciones en la concentración de 2,4-D.

Nivel	Variable dependiente	2,4-D (mg·L ⁻¹)			
		0.0	0.5	1	2
Explante	Callo amarillo	8.33 ^b	75.75 ^a	86.11 ^a	75.00 ^a
	Callo café	86.11 ^a	9.09 ^b	11.11 ^b	25.00 ^b
	ES o*	0.00	8.33	16.66	13.88
	ES c*	0.16	0.00	0.08	0.41
Medio	Callo amarillo	16.66	45.45	33.33	27.77
	Callo café	8.33	0.00	0.00	0.00
	ES o*	0.00	16.66	13.88	5.55
	ES c*	8.33	0.00	0.00	0.00
	Células s	8.33 ^b	75.00 ^a	66.66 ^a	75.00 ^a
ES Total		25.00	41.66	33.33	41.60

ES= embrión somático, o= oblongo, c = cotiledonar y s= suspendidas. Total= (ESo + ESc del explante) + (ESo + ESc del medio). Los valores con literales iguales no fueron significativamente diferentes (p <0.05).

En la etapa II de la embriogénesis, el antecedente de 2,4-D de la etapa causó cambios significativos en el porcentaje de callo amarillo y café sobre el explante e influyó en el callo amarillo friable así como en las células suspendidas, indistintamente del ambiente luz y oscuridad del cultivo (Tabla 3.3).

La producción de callo amarillo nodular, sobresalió en la concentración $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D en oscuridad ($p < 0.05$). El resto de las concentraciones de 2,4-D mostró porcentajes similares entre las de 0.5 y $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en oscuridad y la de $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en condición de luz ($p < 0.05$). En el medio de cultivo la concentración $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D presentó elevados porcentajes de callo amarillo en el medio de cultivo en las combinaciones de luz y oscuridad ($p < 0.05$) (Tabla 3.4).

Las células suspendidas reportaron máxima producción en las dosis 2,4-D y ambientes de luz y oscuridad en correspondencia con lo registrado al callo amarillo friable y con el callo nodular del explante. En las tres concentraciones 2,4-D desarrollaron los callos café friable y blancos en el medio de cultivo. El callo blanco se manifestó en oscuridad a concentraciones 1 y $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D, aunque el 2,4-D no mostró efecto significativo.

En esta misma etapa los embriones somáticos oblongo y cotiledonar formados sobre el explante y en el medio de cultivo no mostraron tendencias claras en relación al nivel de auxina. En cambio, el 2,4-D mostró efecto significativo en producción de embriones totales y el porcentaje de cultivo fue máximo $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 3.3). En oscuridad las concentraciones $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D reportaron mayor porcentaje de explantes con embriones somáticos oblongos indistintamente de su posición adherida o desprendida del explante. El desarrollo de embrión cotiledonar fue más importante en la concentración $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D (Tabla 3.4).

Embriogénesis somática en *Typha domingensis*

Tabla 3.3. ANOVA paramétrico y ANOVA no paramétrico de las respuestas celulares y embriogénicas en la etapa II (% de cultivos). 2,4-D= Concentración antecedente de la Etapa I.

Nivel	Variable dependiente	Fuente de variación	Parámetros estadísticos						
			gl	SC	CM	H _(N=39)	F	P	
Explante	Callo amarillo	2,4-D	3	31130.16	10376.72		7.953	0.000	
		Luz/Oscuridad	1	5279.46	5279.46		4.046	0.053	
		Interacción	3	1885.71	628.57		0.481	0.697	
	Callo cafe	2,4-D	3	40177.22	13392.41		10.379	0.000	
		Luz/Oscuridad	1	242.44	242.44		0.187	0.667	
		Interacción	3	965.04	321.68		0.249	0.861	
	ES oblongo	2,4-D	3			2.388		0.495	
		Luz/Oscuridad	1			0.650		0.420	
	ES cotiledonar	2,4-D	3			4.385		0.222	
		Luz/Oscuridad	1			3.328		0.068	
	Medio	Callo amarillo	2,4-D	3	26385.71	8795.24		5.963	0.002
			Luz/Oscuridad	1	15.15	15.15		0.010	0.919
Interacción			3	6766.67	2255.56		1.529	0.226	
Callo cafe		2,4-D	3			3.866		0.276	
		Luz/Oscuridad	1			1.154		0.282	
Callo blanco		2,4-D	3			4.132		0.247	
		Luz/Oscuridad	1			3.002		0.083	
ES oblongo		2,4-D	3			2.245		0.523	
		Luz/Oscuridad	1			1.140		0.285	
ES cotiledonar		2,4-D	3			6.846		0.076	
		Luz/Oscuridad	1			1.951		0.162	
Células suspendidas		2,4-D	3	61542.9	20514.3		31.797	0.000	
		Luz/Oscuridad	1	2181.8	2181.8		3.381	0.075	
		Interacción	3	2685.7	895.2		1.387	0.264	
ES Total									
		2,4-D		21471.4	7157.1		3.728	0.021	
		Luz/Oscuridad		136.36	136.3		0.071	0.791	
		Interacción		2385.7	2385.7		0.414	0.743	

ES= embrión somático, Total= La suma de ES en el explante y medio de cultivo.

Tabla 3.4 Porcentajes de cultivos de *Typha domingensis* con estructuras embriogénicas y no embriogénicas sobre el explante y el medio de cultivo en la etapa II. 2,4-D= Concentraciones antecedentes de la Etapa I.

Sitio	Variable dependiente	Luz				Oscuridad			
		0.0	0.5	1	2	0.0	0.5	1	2
	2,4-D (mg·L ⁻¹)								
Explante	Callo amarillo	0.00	33.33 ^{bc}	26.66 ^{bc}	66.66 ^{ab}	0.00	66.66 ^{ab}	60.00 ^{ab}	93.33 ^a
	Callo café	93.33 ^a	39.99 ^{cd}	40.00 ^{cd}	0.00	86.66 ^{ab}	20.00 ^{cd}	46.66 ^{bc}	0.00
	ES o	0.00	0.00	6.66	16.66	0.00	20.00	13.33	6.66
	ES c	0.00	0.00	6.66	33.33	0.00	0.00	0.00	0.00
Medio	Callo amarillo	0.00	20.00 ^{bc}	60.00 ^{ab}	75.00 ^a	0.00	60.00 ^{ab}	26.66 ^{abc}	73.33 ^a
	Callo café	33.33	0.00	0.00	41.66	6.66	13.33	0.00	0.00
	Callo blanco	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	20.00	20.00
	ES o	0.00	20.00	6.66	25.00	0.00	20.00	0.00	0.00
	ES c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	13.33
	Células s	0.00	60.00 ^b	80.00 ^{ab}	100.0 ^a	0.00	100.0 ^a	100.00 ^a	100.0 ^a

o= oblongo, c = cotiledonar y s= suspendidas. Los valores con literales iguales no fueron significativamente diferentes (p <0.05).

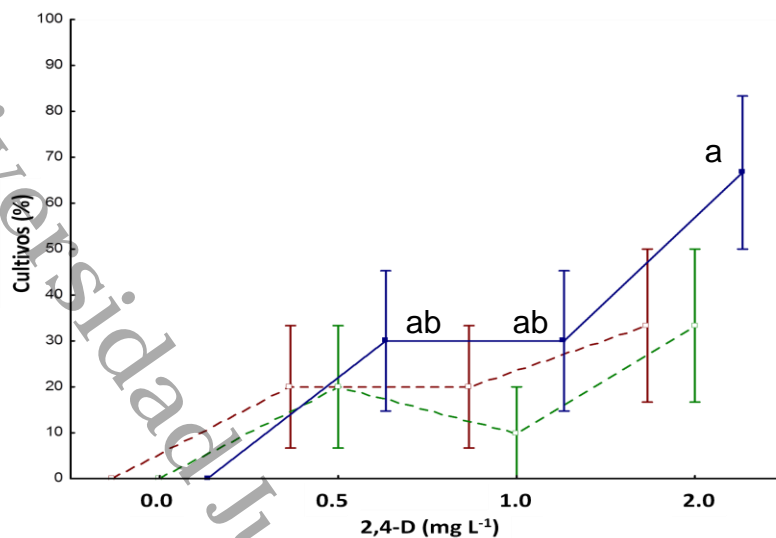


Figura 3.3 Embriones somáticos formados en los cultivos de *Typha domingensis* por la concentración de 2.4-D (Etapa II). Línea sólida con cuadrados = ES total, línea discontinua con cuadrados color rojo = ES total en el explante, línea discontinua con cuadrados color verde = ES total en el medio de cultivo. ES= embrión somático. Líneas verticales = promedios \pm error estándar. Literales diferentes indican diferencias a $p < 0.05$.

La respuesta organogénica fue manifestada sobre el callo nodular mostrando efectos significativos sobre la regeneración de hojas del fitorregulador, en las raíces el ambiente de cultivo y la interacción de este con el 2,4-D (Tabla 3.5). Las hojas se regeneraron sin 2,4-D con luz y en oscuridad, aunque en la primera presentaron pigmentación verde (Figura 3.2 e). La formación de raíz sobre el callo fue altamente significativa cuando existió un ambiente sin luz (Figura 3.2 h). En un ambiente obscuro el 100% de los explantes forman raíces cuando fueron expuestas a 2 mg·L⁻¹ de 2,4-D (Tabla 3.6), mientras que con luz el mayor porcentaje se presentó en aquellos cultivos sin fitorregulador.

Las morfologías de las estructuras embriogénicas y los diferentes estados de expresión del embrión somático en la secuencia del método optimizado multietapas de *T. domingensis* se visualizan en la Figura 3.2 y los cambios

distintivos de los grados de desarrollo dentro del proceso global de embriogénesis somática en el mapa destino en la Figura 3.4. El mapa destino se reconstruyó en dos fases cruciales, subdivididas en vías morfogénicas específicas. La primera fase indica las vías para la formación de callo embriogénico y su subsecuente diferenciación a embrión somático y la segunda fase se compone de las vía para callo organogénico y proliferación de hoja y raíz.

Tabla 3.5. ANOVA paramétrico y no paramétrico con respuestas organogénicas de los explantes de *Typha domingensis* en las etapas I y II. 2,4-D= Concentraciones antecedentes de la Etapa I.

Etapa	Variable dependiente	Fuente de variación	Parámetros estadísticos					
			gl	SC	CM	H _(N=39)	F	P
I	Hoja	2,4-D	3			36.544		0.0001
		Hoja						
	2,4-D	26742.860	8914.286		22.206	0.000		
II	Hoja	Luz/Oscuridad	107.744	107.744		0.268	0.608	
		Interacción	330.160	110.053		0.274	0.843	
		2,4-D	11249.210	3749.740		2.542	0.074	
	Raíz	Luz/Oscuridad	13335.020	13335.020		9.041	0.005	
		Interacción	14677.780	4892.590		3.317	0.032	
		2,4-D						

Tabla 3.6 Porcentaje de explantes de *Typha domingensis* con organogénesis de hoja y raíz en la etapa II. 2,4-D= Concentraciones antecedentes de la Etapa I.

Etapa	Variable dependiente	Luz				Oscuridad			
		0.0	0.5	1	2	0.0	0.5	1	2
	2,4-D (mg·L ⁻¹)								
II	Hoja	66.6 ^a	0.0	0.0	0.0	53.3 ^a	0.0	0.0	0.0
	Raíz	66.6 ^{ab}	0.0	0.0	25.0 ^{bc}	40.0 ^{bc}	60.0 ^{ab}	40.0 ^{bc}	100.0 ^a

Los valores con literales iguales no fueron significativamente diferentes (p <0.05).

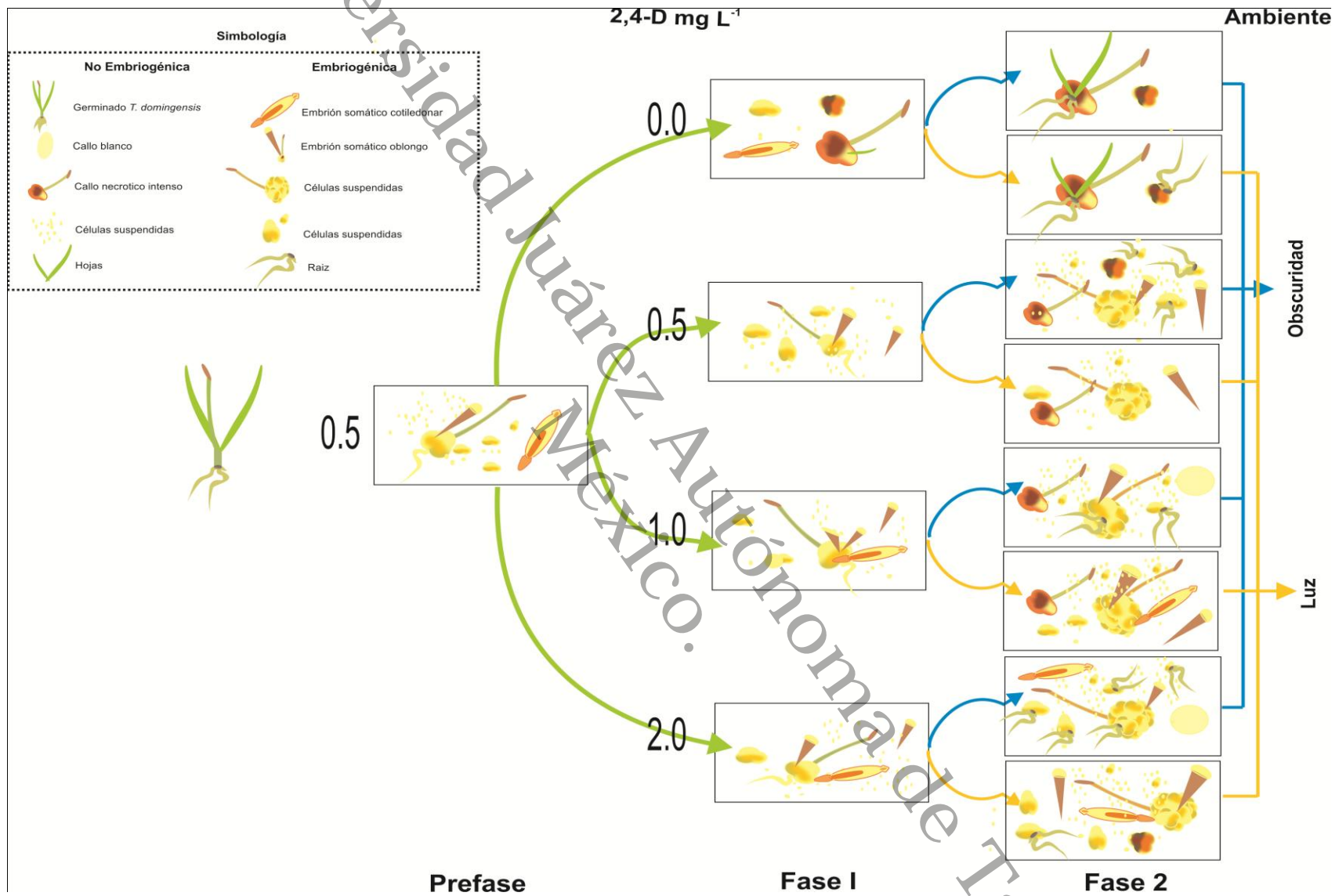


Figura 3.4 Mapa destino de la vía de desarrollo embriogénica del embrión somático en *Typha domingensis* en sistema multietapas.

Discusión

En la embriogénesis somática de *Typha domingensis* los resultados fueron favorables en términos de optimización del modelo de estudio en una secuencia de cultivo intermitente de tres etapas embriogénicas. Las etapas fueron diseñadas para cumplir objetivos específicos de iniciación de cultivo embriogénico (Etapa 0), proliferación de callo embriogénico (Etapa I) y maduración de embriones somáticos (Etapa II). Las respuestas de callo embriogénico, no embriogénico, células suspendidas y embriones somáticos presentaron morfologías y procesos similares al proceso de embriogénesis progresiva en cultivo por lote (Capítulo 1). Sin embargo, varias diferencias en el tiempo, calidad y cantidad en la etapa 0 determinaron la secuencia y velocidad de la embriogénesis de las etapas posteriores. La regeneración de hoja y raíz fueron respuestas nuevas en esta etapa embriogénica.

Las diferencias en la etapa 0 fueron registradas en los porcentajes de abultamiento del explante y callo embriogénico, la ausencia de callo necrosado y en la rapidez de la formación del embrión somático hasta formas oblonga y en menor proporción cotiledonar.

El incremento de alrededor de 20 puntos porcentuales en el abultamiento en la base caulinar del germinado y 10 puntos porcentuales en callo embriogénico amarillo fueron importantes comparado con la misma condición ambiental y de regulador de crecimiento del estudio anterior. Los callos obtenidos en la concentración $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D a partir de germinados de *Scirpus robustus* y las inflorescencias de 41 especies de monocotiledóneas de humedales representadas en su mayoría por las familias Cyperaceae, Juncaceae, Poaceae y Typhaceae (Wang *et al.* 2006, Czako *et al.* 2006), mostraron competencia embriogénica y el desarrollo de embriones somáticos en las familias citadas. En *Panicum virgatum* el callo embriogénico fue inducido en oscuridad usando 10 veces más la concentración de 2,4-D (Burriss *et al.* 2009). Por lo tanto, la concentración $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D *in vitro* fue eficiente para producir callo

embriogénico usando explantes de germinados de *T. domingensis*. La ausencia de callo necrosado a 28 días fue adjudicado al efecto antioxidante del ácido ascórbico adicionado exprofeso al medio de cultivo. El efecto colateral del ácido ascórbico parece haber beneficiado la velocidad de formación y dio mayor definición visual del callo embriogénico y transición a la diferenciación de embriones somáticos de *T. domingensis*. El efecto antioxidante propició que los objetivos de las etapas 0, I y II se presentarán simultáneamente en todas las etapas del cultivo, ya que en la experiencia previa de embriogénesis progresiva de *T. domingensis* los embriones somáticos surgieron hasta el día 42. El ácido ascórbico ha mostrado un efecto potenciador en el desarrollo embriogénico de *Artocarpus sp* (Dan 2008) y redujo el porcentaje de obscurecimiento del explante en *Rubus idaeus*, *Protea cynaroides* y *Adonis amurensis* (Dan 2008).

En este sentido, la eficiencia del cultivo en el tiempo produjo en *Passiflora cincinnata* el embrión somático globular a los 26 días y el embrión somático corazón, torpedo y cotiledonar hasta el día 32, en *Cocos nucifera* el embriones somático tipo torpedo se formó a los 15 días y en *Phragmites australis* los de tipo globular se obtuvieron en medio libre de fitorregulador a los 56 días (Rocha *et al.* 2011; Azpeitia *et al.* 2009; Lauzer *et al.* 2000). Por la acelerada formación de embriones la generación del modelo de embriogénesis de *T. domingensis* sincrónico no fue factible, pero en términos de eficiencia técnica fue importante.

Conforme a los resultados de las etapas I y II la mayor producción de callo embriogénico amarillo en el explante y el medio de cultivo en presencia de 2,4-D fue una característica distintiva que hizo predominante el embrión somático más orientado al desarrollo de formas oblongas que cotiledonares. Aunque en la etapa I la influencia de la concentración de fitorregulador y del ambiente de cultivo en la formación de los dos tipos de embriones o sobre el total no pudo ser discriminada estadísticamente. En la etapa de maduración este efecto benefició en el mayor porcentaje de embriones totales con $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D. El porcentaje total de cultivos con embriones somáticos fue mayor en luz que en oscuridad continuando

el predominio de embriones oblongos de la etapa anterior. En contraste, el callo embriogénico café que se manifestó en ausencia de 2,4-D solo registró incipientemente formas cotiledonares. Con 66.66% de embriones somáticos totales *T. domingensis* reportó en la etapa de maduración eficiencias mayores que las registradas en las inflorescencias de *Phragmites australis* y *Panicum virgatum* de 18.7 y 33% % con 2.0 y 0.5 mg·L⁻¹ de 2,4-D respectivamente, estas especies son morfotipos ecológicos similares a la especie *Typha* (Burris *et al.* 2009; Lauzer 2000) y germinados de *T. angustifolia* formaron embriones somáticos con 0.25 mg·L⁻¹ de 2,4-D (Rogers 2003)

Es relevante destacar que el callo blanco de aspecto globular-translúcido viscoso reconocido en el 20% de los cultivos en la concentración 2.0 mg·L⁻¹ de 2,4-D hasta los 84 días en cultivo por lote se produjo limitadamente hasta la tercera etapa de embriogénesis. En *Phragmites australis* el callo blanco se ha descrito no embriogénico y se ha caracterizado por su superficie viscosa (Lauzer *et al.* 2000). Especies distantes como *Panicum virgatum* y *Musa sp* que han sido muy estudiadas por su importancia comercial y en fitorremediación, describen al callo blanco embriogénico, altamente friable, de rápido crecimiento y sumamente regenerativo ideal para iniciar suspensiones celulares (Burris *et al.* 2009; Strosse *et al.* 2003). La hidrófita flotante *Nymphoides cristatum* produjo tardíamente y después de varios subcultivos el callo blanco, pero independientemente del color formó embriones somáticos (Niranjan *et al.* 2008).

En contraposición a la capacidad embriogénica del callo amarillo las evidencias fotográficas revelaron que el callo café manifestó organogénesis indirecta. La organogénesis de hoja en la etapa I se mantuvo hasta el final del experimento en ausencia de 2.4-D. La organogénesis indirecta de la raíz fue otro hallazgo que de acuerdo con el mapa destino de la embriogénesis permite definir una vía de propagación alternativa para esta especie como medida a corto plazo para las aplicaciones que dé lugar este conocimiento en materia de rehabilitación de ecosistemas acuáticos. Rogers *et al.* (1998) indujo callo organogénico en la misma

especie pero en oscuridad a 0.9, 4.58 y 9.17 mg·L⁻¹ de 2,4-D a partir de germinados en solo 8 días con un 100% de producción en los explantes. Esta vía organogénica también se ha presentado en otras acuáticas emergentes como *Juncus gerard* con 0.5 mg L⁻¹ de 2.4-D a partir de inflorescencias, *Spartina patens* y *Juncus roemerianus* con 1.0 y 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D a partir de semilla y en *Spartina alterniflora* y *Scirpus robustus* con 1.0 y 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D a partir de germinados (Wang *et al.* 2006).

En *Typha domingensis* los resultados experimentales del sistema de embriogénesis somática favorecieron la diferenciación indirecta de embriones somáticos de los callos embriogénicos amarillos adherido al explante y suspendidos. La diferenciación organogénica de hojas y raíces se manifestó en el callo no embriogénico. El callo constituye una vía factible para la optimización del sistema multietapas, por lo cual se requiere continuar con nuevas estrategias de investigación que permitan esclarecer las diversas vías de desarrollo de novedosos modelos del proceso embriogénico y organogénico hasta ahora desconocidos en *T. domingensis*.

Histodiferenciación en embriones somáticos de *Typha domingensis*

Resumen

El estudio histológico se realizó para caracterizar el estado de madurez de los embriones somáticos originados de germinados *in vitro* de *Typha domingensis*. El método comprendió la inducción a callogénesis en $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D (Etapa 0), expresión embriogénica en tres concentraciones de $0.0 - 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D (Etapa I) y maduración del embrión somático en ambiente de luz y oscuridad (Etapa II). El 30% de las muestras y tratamientos de cada etapa fueron procesados usando técnicas histológicas convencionales. La tinción se realizó con azul de toluidina. El análisis histológico mostró que los callos sobre el explante presentaron zonas de células meristemáticas y embriogénicas de elevada actividad y un gradiente de desarrollo del embrión somático en todas las fases de cultivo. El embrión evolucionó hasta la etapa cotiledonar en ausencia y presencia de luz y presentó capa, masa y tubo proembrional y suspensor. La diferenciación de hojas y raíces derivó de la masa callogénica.

Introducción

Typha domingensis (Espadaño) forma parte de las hidrófitas emergentes que habitan en los humedales (Novelo & Ramos 2007) y es la más común de Norte y Centro América (Rzedowski & Rzedowski 2005). Aunque esta especie es clave para la funcionalidad del ecosistema por su amplia distribución y abundancia es susceptible a las amenazas del cambio climático. Los diferentes modelos predictivos del cambio climático señalan que los humedales y sus especies son los más vulnerables a nivel global (Erwin 2009; Touchette & Steudler 2009; Hersner & Havens 2008; Nicholls 2004) y auguran para la zona costera del Golfo de México una reducción de más del 40% (Pachauri & Reisinger 2007).

En la actualidad las hidrófitas acuáticas forman parte de varios programas de investigación básica y aplicada para su producción masiva, conservación y/o aprovechamiento potencial (Hidalgo *et al.* 2005; Sheehan *et al.* 1998). Por lo tanto las investigaciones en relación a la biología de su reproducción y conservación conviene que sean promovidas por el desconocimiento social del valor ecológico de *Typha* y por las prácticas inadecuadas de manejo de los humedales a nivel mundial (Tulbure *et al.* 2007; Linz & Homana 2011).

La embriogénesis somática es una alternativa de investigación basada en el cultivo *in vitro* usada como sistema modelo para estudios embriológicos porque ofrece un panorama prometedor en la producción y conservación de plantas (Von Arnold 2008; Quiroz-Figueroa *et al.* 2006; Fehér *et al.* 2003). Los resultados de la embriogénesis somática de *T. domingensis* usando germinados completos como explantes y medio nutritivo de MS_{0.5} reportaron baja eficiencia en proliferación de embriones somáticos (Capítulo 1 y 2) en concentraciones de 0.0 - 2.0 mg·L⁻¹ de 2,4-D.

Asimismo, la calidad de los embriones somáticos producidos en la fase de maduración derivados del gradiente anterior 2,4-D fue ineficiente con los descriptores morfológicos que determinaron su estado de desarrollo hasta formas

globulares y cotiledonar. La correlación entre la apariencia callosa y la competencia embriogénica debe ser confirmada mediante análisis histológicos para definir estructuras típicas que conducen a la formación del embrión somático maduro.

En esta parte de la investigación se describe la histogénesis *in vitro* de *Typha domingensis* en las etapas de inducción proembriogénica, embriogénica y maduración del embrión somático, con énfasis en la determinación de la calidad del embrión somático en relación a la concentración de 2,4-D y el ambiente físico de cultivo y en la revelación del origen celular del mismo.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Método

El manejo de material biológico de *T. domingensis*, la técnica de cultivo con condiciones de asepsia para la regeneración de los germinados y las condiciones químicas nutricionales y físicas establecidas para desarrollar la embriogénesis somática de *Typha domingensis* se concentran en la Tabla 4.1. El método de embriogénesis incluyó la etapa 0 o de inducción de callo embriogénico, etapa I o expresión de la diferenciación embriogénica y etapa II de maduración de embriones somáticos

Tabla 4.1. Condiciones experimentales en el proceso de embriogénesis somática de *Typha domingensis*.

Condiciones	EXPERIMENTO			
	Etapa 0	Etapa I	Etapa II	
Explante: primario* Secundario**	Germinado 9 días*	Estructuras embriogénicas y no embriogénicas de la Etapa 0**	Estructuras embriogénicas y no embriogénicas de la Etapa I**	
Flujo de fotones (RFA) Fotoperiodo	Oscuridad	Oscuridad	Oscuridad	20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 16/8 h
Temperatura (°C)	25 \pm 5			
Unidad experimental	Recipiente de vidrio (125mL) con tapa de policarbonato			
Medio de cultivo***	MS _{0.5} (Murashige & Skoog 1962), 3% de sacarosa y 10 mg L ⁻¹ de ácido ascórbico en 25 mL /frasco.			
2,4-D (mg/L)	0.5	0.0, 0.5, 1.0 y 2.0	0.0	0.0
Duración de la prueba (días)	28	28	28	

***Esterilizado en autoclave 121° C y 104 kPa durante 25 min

Preparación y caracterización de tejidos

El 30% de las unidades de cultivo fueron seleccionadas completamente al azar al finalizar el periodo de cada fase embriogénica (etapa 0, etapa I y etapa II) para el análisis histológico. Los productos embriogénicos generados sobre el explante y suspendidos en el medio de cultivo se fijaron en una solución de formol-acetoalcohol (FAA) durante 24 h (Sandoval 2005). Los tejidos fijados se deshidrataron y aclararon consecutivamente en concentraciones creciente de alcohol etílico 70 a 100%, etanol-xilol 1:1 y xilol 100%, durante 30 min cada una, conforme a la

modificación de Filonova *et al.* (2000). Las muestras fueron incluidas en xilol:parafina (Paraplast Leyma microsistemas) en relación 1:1, luego en parafina 1 y parafina 2, durante 1 h cada una. Los bloques de parafina se obtuvieron con el inclusor automático (Tissue embedding center Reichert-Jung) y se dejaron enfriar por 24 h. Los cortes histológicos se realizaron con el micrótopo de deslizamiento y fueron transversales y seriados, de 6 µm de espesor (Reichert-Jung Hn 40). Los cortes se tiñeron con las técnicas de azul de toluidina y hematoxilina-eosina al 0.2 %, después las secciones fueron preservadas con resina sintética. Las muestras se secaron a 40°C durante 7 días en estufa. El excedente de resina se eliminó limpiando con alcohol al 50%. Las preparaciones histológicas se analizaron en foto microscopio Carl Zeiss modelo Axiostar Plus, equipada con cámara digitalizadora Carl Zeiss Axiocam modelo MRC5 (Anexo 2).

La organización celular y diferenciación histogénica durante el proceso de embriogénesis somática de *T. domingensis* se identificó con base en las características distintivas de la célula meristemática o embriogénica y de diferentes descriptores tisulares del embrión somático en sus diferentes estados de desarrollo que han sido citados en especies acuáticas como *Panicum virgatum* (Burriss *et al.* 2009), *Oryza sativa* (Vega *et al.* 2009; Mariani *et al.* 2002), *Phragmites australis* (Máthe *et al.* 2000) y en referencias de especies terrestres monocotiledóneas que han sido objeto de análisis histológicos como *Cocus nucifera* (Azpeitia *et al.* 2009; Verdeil *et al.* 2001) y dicotiledóneas *Phoenyx dactilifera* (Sané *et al.* 2006), *Passiflora cincinnata* (Rocha *et al.* 2011) y *Camellia japonica* (Barciela & Vieitez 1993) y *Picea abies* (Filonova *et al.* 2000) una gimnosperma.

Resultados

Los diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos de *Typha domingensis* fueron identificados histológicamente basados en la arquitectura organizacional y características distintivas de células meristemáticas y/o embriogénicas y cinco tejidos diferenciados. Los tejidos presentes fueron embriogénico, meristemático, vascular, parenquimático y protector.

Las células meristemáticas fueron pequeñas, esféricas, intensamente teñidas en azul y en algunos casos en púrpura. Los núcleos fueron grandes y los nucléolos prominentes a 1000x (Figura 4.1 a, b y c). Estas células se organizaron en forma de capas concéntricas conformando el tejido meristemático con zonas de gran actividad mitótica que dieron origen al crecimiento e histodiferenciación del callo.

Las células embriogénicas se encontraron aisladas y/o en grupos pequeños de 5 ± 2 células, generalmente ubicadas sobre la misma dirección de crecimiento del tejido meristemático del callo amarillo (Figura 4.1b) hacia la periferia. Las células embriogénicas fueron ovaladas con gránulos intensamente teñidos en azul-verde y presentaron mayor tamaño que las meristemáticas; en algunos casos se apreció su actividad mitótica y la formación de masas proembriogénicas (Figura 4.1d).

El tejido de parénquima que constituyó la mayor parte del callo se visualizó en la zona no embriogénica. Este tejido se identificó por la forma prismática de las células, el borde redondeado, el núcleo poco visible y una gran vacuola central con paredes fuertemente teñidas en azul. El tejido epidérmico se conformó de células de aspecto rectangulares y/o estrelladas, generalmente transparentes a excepción de la pared celular que se tiñó levemente de azul-verde.

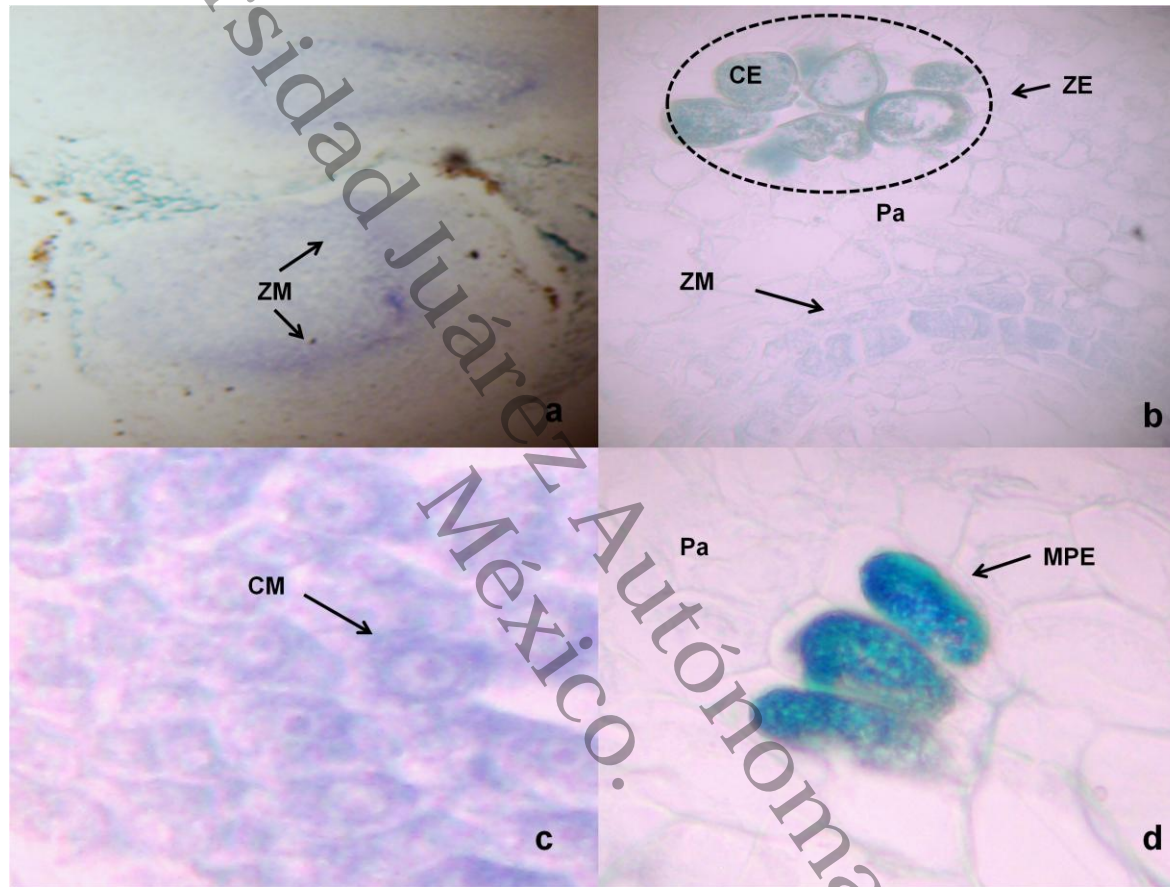


Figura 4.1 Células meristemáticas y embriogénicas en cortes histológicos de callo amarillo de *Typha domingensis*. (a): Secciones transversales de callo amarillo de 28 días. (b): Ampliación de la zona meristemática y embriogénica de callo amarillo (c): Detalles de las células meristemática (d): Detalle de la masa proembriogénica. ZM: Zona meristemática. ZE: Zona embriogénica. CM: Células meristemáticas. CE: Células Embriogénicas. MPE: Masa proembriogénica. Pa: Parénquima. Azul de Toluidina. (a) =100x, (b) =400x, (c) y (d) = 1000x

El proceso regenerativo fue visualizado solo en los callos cafés. Ninguna regeneración fue evidenciada de embriones somáticos. Las hojas que se derivaron del callo presentaron parénquima clorofílico, haz vascular y meristemo apical. En el caso de las estructuras que desarrollaron raíz mostraron meristemo radical, zona de diferenciación celular y la caliptra. Estos tejidos fueron clave en la identificación de estructuras organogénicas.

La histodiferenciación del callo amarillo a embrión somático de *Typha domingensis* durante las etapas embriogénicas de inducción, expresión y maduración se ilustra en la Figura 4.2. Los estados de desarrollo identificados fueron: proembriogénesis, embriogénesis temprana (sin polaridad y meristemos fundamentales) y embriogénesis tardía (con polaridad y meristemos fundamentales) caracterizados en cinco estados de histodiferenciación que fueron las masas proembriogénicas, embrión somático tipo globular, oblongo, escutelar y maduro (Figura 4.2). Todos los estados embriogénicos se observaron simultáneamente en las tres etapas de cultivo. La variabilidad morfológica en la formación del embrión somático en todas las concentraciones de 2,4-D y el ambiente de oscuridad o luz fueron registrado histológicamente.

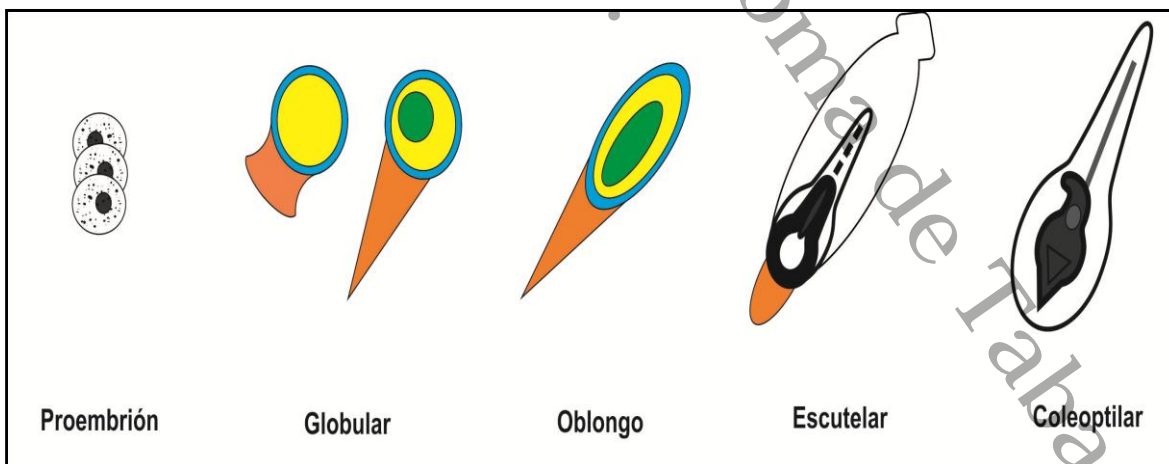


Figura 4.2 Modelo esquemático del patrón de desarrollo de embriogénesis somática en *Typha domingensis*. Código de colores: amarillo: tejido fundamental, verde: procambium, azul: protodermo y naranja: suspensor.

El callo amarillo o embriogénico presentó zonas celulares claramente delimitadas por la actividad meristemática, embriogénica, no embriogénica y de transición. Las células del callo amarillo se caracterizaron por presentar crecimiento periclinal y anticlinal, y un crecimiento masivo de células esféricas. Este conglomerado celular en división formó un complejo de aspecto globular irregular con múltiples nódulos constituidos en su mayoría de tejido parenquimático ó no embriogénico y nuevas zonas meristemáticas (Figura 4.3 a).

En dirección a la periferia del callo se distinguió: la zona meristemática que comprendió un conjunto de capas desorganizadas de células pequeñas e isodiamétricas intensamente teñidas en azul o púrpura (Figura 4.3 b y c). La capa externa a estas zonas meristemáticas se caracterizó por presentar sitios con adquisición de la competencia embriogénica misma que fue determinada por la individualización de células embriogénicas intercaladas en el tejido meristemático formando las masas proembriogénicas (Figura 4.3 c).

La proembriogénesis se atribuyó a los racimos de células embriogénicas o masas proembriogénicas situados sobre la periferia del callo (Figura 4.1 b y d). Estas masas proembriogénicas crecieron hasta formar una esfera que sobresalió del callo y se denominó embrión somático globular (ESg) (Figura 4.4 a y b). El ESg presentó una capa de protodermo que envuelve a la capa de meristemo fundamental y el procambium (Figura 4.4 b). El conjunto de tejidos se sitúan sobre un suspensor rudimentario en forma de abanico. El ESg presentó polaridad radial más no sobre el eje. El embrión somático tardío mostró parénquima de reserva y polaridad sobre el eje. Todos los embriones somáticos mostraron una conexión entre el tejido callogénico y el embrión somático, esta conexión se denominó tubo suspensor.

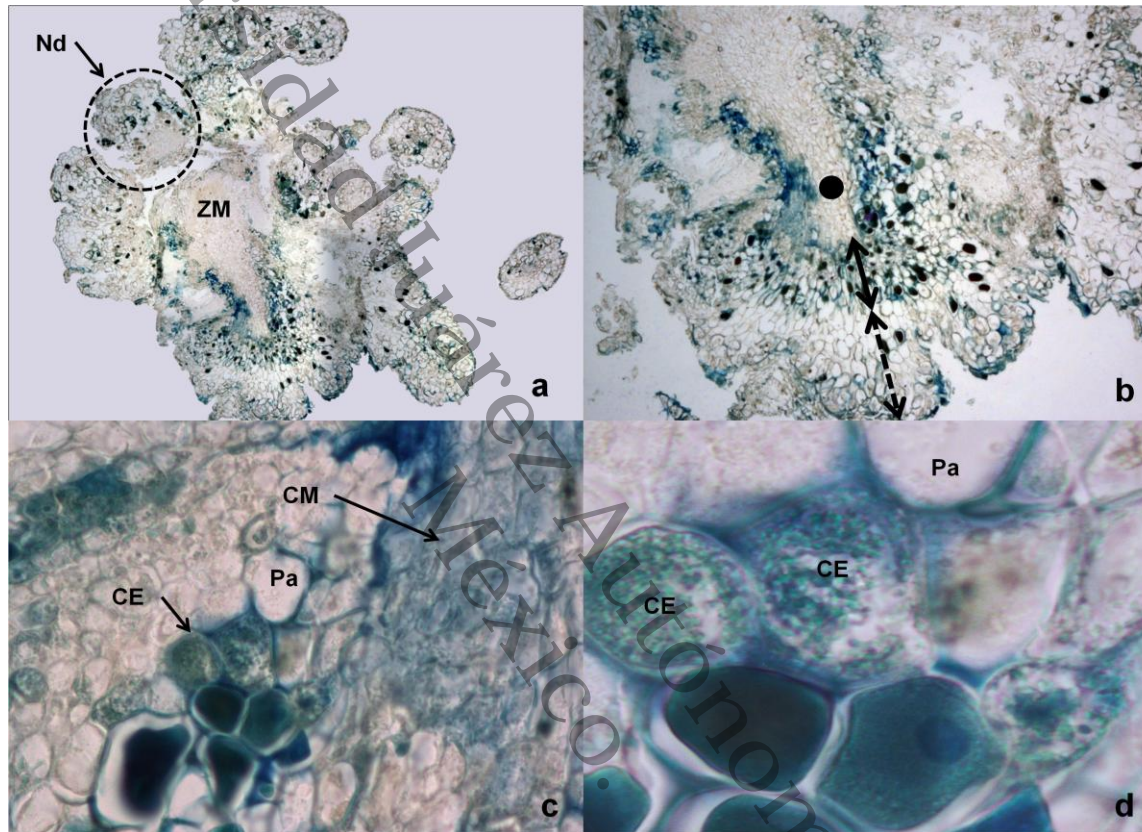


Figura 4.3 Histodiferenciación en los callos de *Typha domingensis*. (a): Sección transversal de callo amarillo de 56 días. (b): Zona de tejidos; meristemático [●], transición [↔] y no embriogénico [◀]. (c): Detalle de zona de transición con actividad meristemática y embriogénica (d): Detalle de células embriogénicas. CM: Células meristemáticas. CE: Células Embriogénicas. MPE: Masa proembriogénica. Pa: Parénquima. ZM: Zona meristemática. Nd: Nódulo. Azul de Toluidina. (a) =100x, (b) =200x, (c) =400x y (d) =1000x.

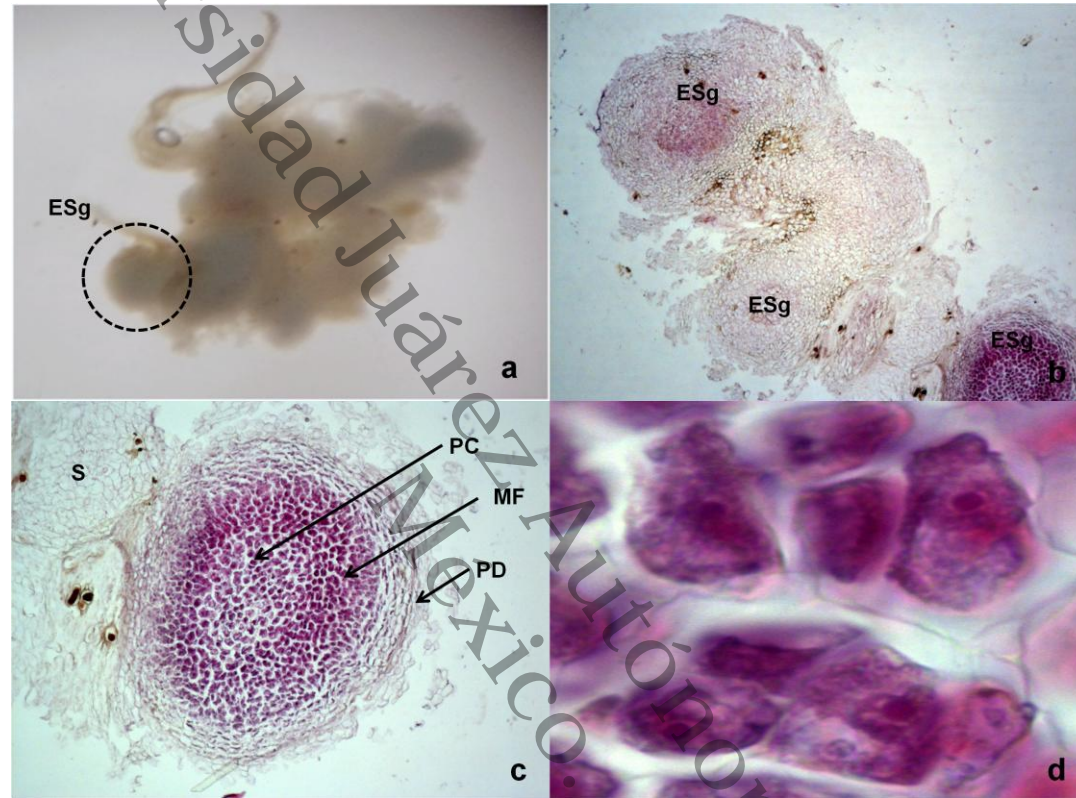


Figura 4.4 Histodiferenciación de embrión somático globular de *Typha domingensis*. (a): Embrión somático globular sobre callo amarillo de 56 días. (b): Sección transversal de embriones somáticos globulares en diferentes grados de desarrollo. (c): Diferenciación de tejidos en embrión somático globular (d): Detalle de células embriogénicas. ESg: Embrión somático globular. MF: Meristemo fundamental. PD: Protoderma. PC: Procambium. S: Suspensor. Hematoxilina-eosina. (a) =10x, (b) =400x, (c) y (d) = 1000x.

La elongación del ESg tomó un aspecto oblongo (Figura 4.5 a) que da inicio a una polaridad apical. En el embrión somático oblongo (Eso) se observó una mayor histodiferenciación de la protodermis, procambium y meristemo fundamental (Figura 4.5 b y c). En esta etapa tanto el embrión como el suspensor alargan sus formas en una proporción 1:1 (Figura 4.5 b). El ESo presentó parénquima en cuyas vacuolas mostró acumulación de almidón en estructuras de amiloplastos. Los amiloplastos fueron abundantes y se observaron como esferas transparentes con mayor birrefringencia en el centro (Figura 4.5 c).

El ESo dio origen a un embrión somático morfológicamente más complejo (Figura 4.6 a), de aspecto cilíndrico con uno de sus extremo ensanchado y el otro con forma de punta o carente de esta, rodeado de una envoltura elipsoide de apariencia globosa y transparente. El análisis histológico permitió discernir a la estructura cilíndrica como el escutelo, atribuible al embrión somático escutelar (ESesc). El ESesc en su fracción ensanchada alojó un eje procambial con células pre-vasculares esporádicas (Figura 4.6 b). La estructura globosa que encapsuló al embrión estuvo constituida de tejido epidérmico. En este grado de desarrollo el suspensor fue pequeño (Figura 4.6 c).

Del total de embriones somáticos analizados, éste patrón histogénico fue similar, en la mayoría de los casos. No obstante un embrión somático proveniente de un ambiente iluminado presentó un mayor grado de diferenciación. Esta estructura se caracterizó por presentar un eje meristemático definido, donde se observó claramente el meristemo apical y el meristemo radicular (Figura 4.7 d). Sobre el meristemo apical se volvió evidente una protuberancia denominada coleóptilo. El embrión somático coleoptilar (EScol) presentó una morfología única con respecto a los ESesc (Figura 4.7 a). El corte longitudinal en el EScol evidenció la presencia de células vasculares en la región próxima al embrión, a lo largo del escutelo (Figura 4.7 c) constituido de células de parénquima de reserva, rica en amiloplastos.

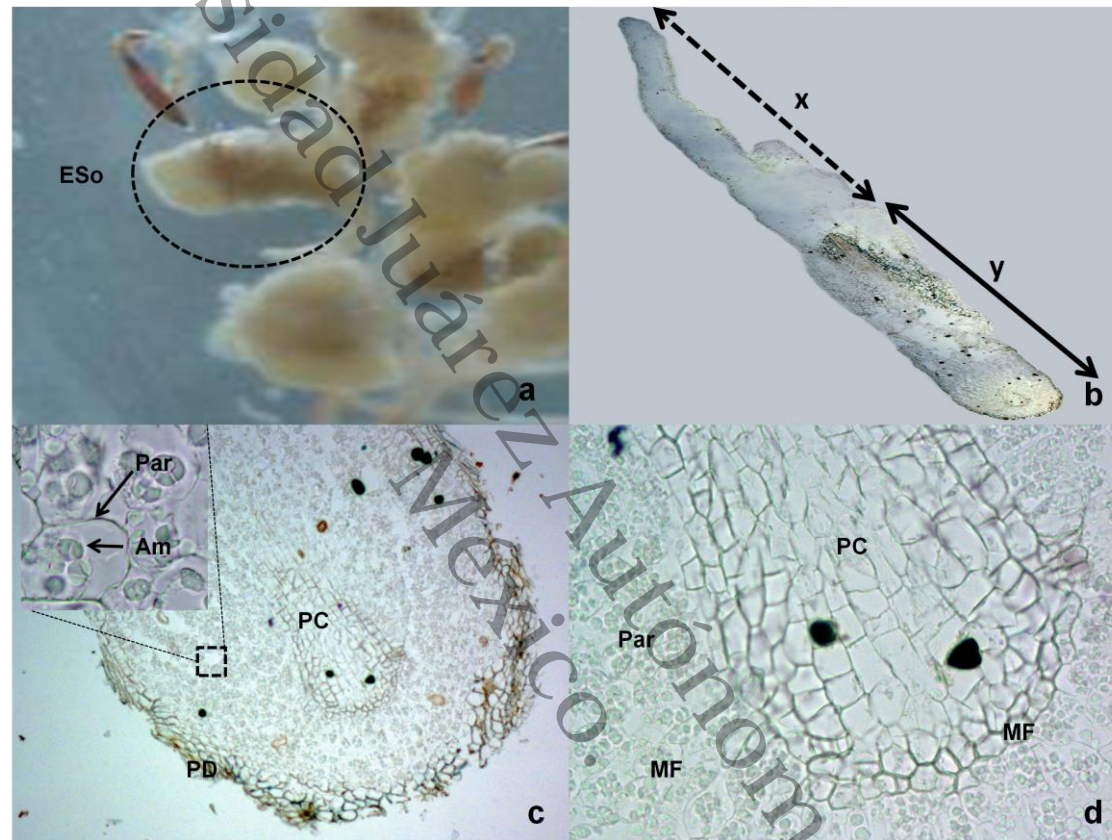


Figura 4.5 Histodiferenciación de embrión somático oblongo de *Typha domingensis*. (a): Embrión somático oblongo sobre callo amarillo de 56 días. (b): Sección longitudinal de embrión somático oblongo, suspensor flecha con la letra x [x↔] y embrión somático oblongo flecha con la letra y [y↔]. (c): Diferenciación de tejidos en embrión somático oblongo (d): Detalle de células de parénquima reserva y procambium. ESo: Embrión somático oblongo. PC: Procambium. PD: Protoderma. MF: Meristemo fundamental. Par: Parénquima de reserva. Am: Amiloplasto. (a) =5x, (b) =100x, (c) =200x y (d) = 400x.

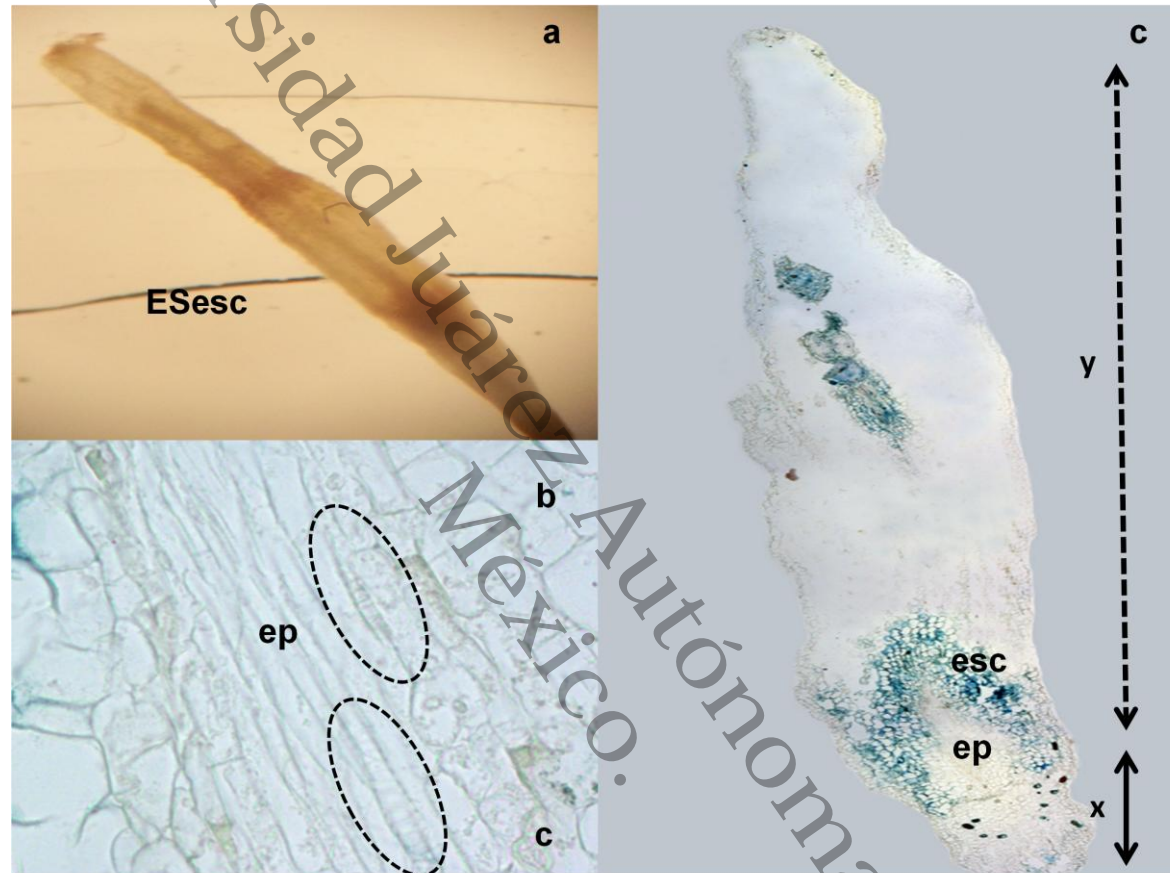


Figura 4.6 Histodiferenciación del embrión somático escutelar de *Typha domingensis*. (a): Morfología del embrión somático escutelar. (b): Detalle del tejido vascular en la zona apical. (c): Sección longitudinal del embrión somático escutelar, suspensor flecha con la letra x [x ←] y embrión somático escutelar flecha con la letra y [y ←]. ESesc: Embrión somático escutelar. ep: Eje procambial. c: cotiledon. Azul de Toluidina. (a) =50x, (b) =400x, (c) =400x.

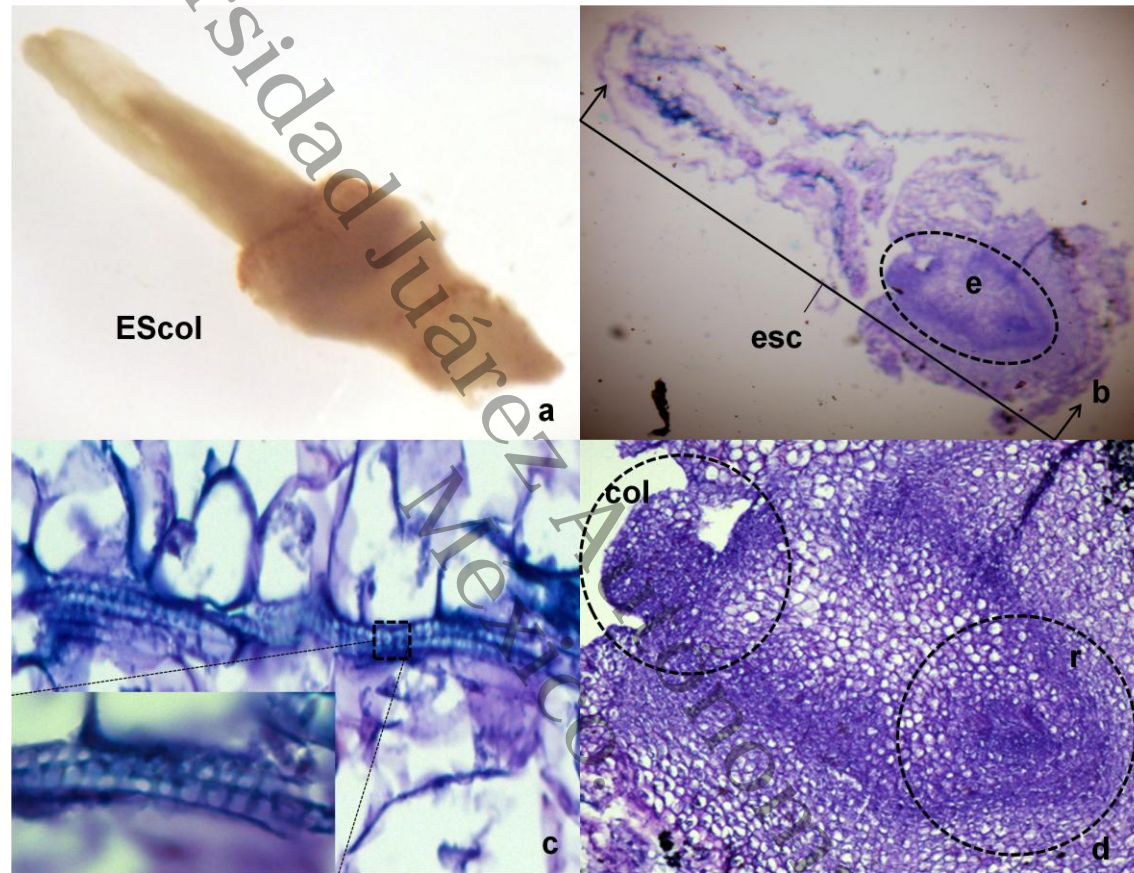


Figura 4.7 Histodiferenciación del embrión somático coleoptilar de *Typha domingensis*. (a): Morfología de EScol. (b): Sección longitudinal de EScol. (c): Detalle de tejido vascular. (d): Detalle de coleoptilo y radícula en EScol . EScol: Embrión somático coleoptilar. col: coleoptilo. r: radícula. e: embrión. esc: escutelo. Azul de Toluidina. (a) =5x, (b) =200x, (c) =1000x, (d) =400x.

Los embriones somáticos presentaron morfologías variadas lo que dificultó la identificación de los diferentes grados de desarrollo, particularmente los estados embriogénicos tardíos. Estas irregularidades estructurales o aberrantes fueron frecuentes en todas las etapas (Figura 4.8).

La pauta para designar un morfotipo normal o estereotipo para la especie *T. domingensis* se basó en las similitudes morfológicas halladas en la semilla de *Typha domingensis* (Figura 4.8 b) y en el análisis histológico descrito para otra especie del mismo género (Figura 8a). Las morfologías aberrantes fueron recurrentes para: embriones fusionados (Figura 4.8 f), embriones doblados sobre su eje (Figura 4.8 e) y embriones con sobreexpresión o supresión de componentes estructurales (Figura 4.8 d y e).

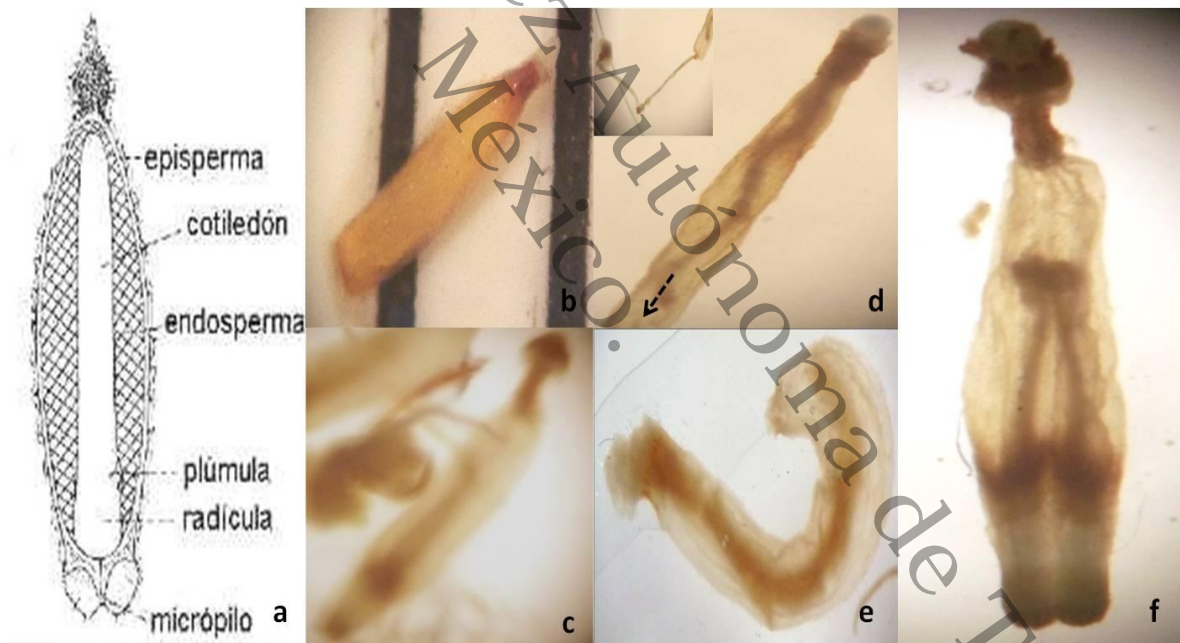


Figura 4.8 Morfología de embriones somáticos de *Typha domingensis* observados en la etapa 0, etapa I y etapa II. (a): Esquema del embrión somático de *Typha angustifolia* (Goebel, 1933). (b): Semilla de *T. domingensis*. (c): Embrión somático escutelar. (d) (e) y (f): Embriones somáticos aberrantes. (b) (c) (d) (e) (f) =10x.

Los datos estudio histológico se construyó el modelo esquemático del patrón de desarrollo de embriogénesis somática en *Typha domingensis* y se comparó con el patrón de desarrollo de embriogénesis somática de especies modelos como *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays* (Figura 4.9).

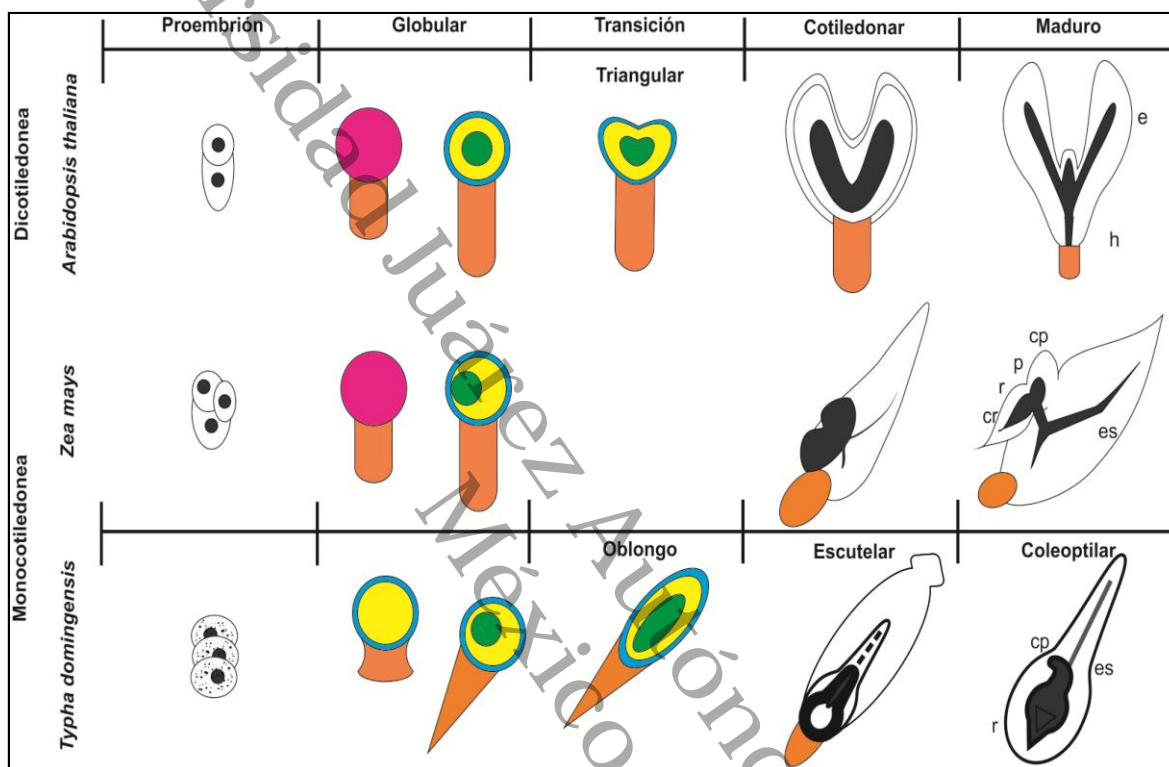


Figura 4.9 Comparación del patrón de desarrollo de embriogénesis somática de *Typha domingensis* con *Zea mays* y *Arabidopsis thaliana* especies usadas como modelos de estudio embriológicos. *Arabidopsis thaliana* (dicotiledónea) modificada de Azcon-Bieto & Talón (2003), *Zea mays* (monocotiledónea) modificada de Forestan (2010) y *Typha domingensis* (monocotiledónea). Las ilustraciones no están a escala. e: epicotilo. h: hipocotilo. cp: coleoptilo. cr: coleoriza. p: plúmula. r: radícula. es: escutelo. Código de colores: Amarillo: Tejido fundamental, Verde: procambium y Azul: protodermo. Rosa: cigoto.

Discusión

Los resultados de este estudio permitieron determinar la vía embriogénica de *T. domingensis* al identificarse marcadores histogénicos claves del modelo de embriogénesis somática en esta misma especie, vía que es única en cada especie (Von Arnold 2008).

La transición de célula somática a embriogénica requiere de una desdiferenciación, activación del ciclo de división celular y reorganización en el diseño fisiológico, metabólico y genético de la célula somática (Fehér *et al.* 2003). En la etapa de inducción, el 2,4-D propició la transición de la célula somática a embriogénica y su consecuente desarrollo a embrión somático que fue distinguida con los mecanismos de división y elongación celular. El 2,4-D es una fitohormona con efecto dual en los cultivos, actúan como auxina y es un factor de estrés. El último efecto desencadena una cascada de señales en el metabolismo que inducen a mecanismos de adaptación y estas incluyen la reprogramación genética hacia a la formación del embrión somático (Fehér *et al.* 2003). Nuevas hipótesis señalan que el potencial embriogénico está genéticamente determinado y permite la expresión de competencia embriogénica bajo condiciones apropiadas las cuales resultarían en el desarrollo del embrión en respuesta a una apropiada señal de desarrollo de la célula solo cuando la condición fisiológica es favorable (Fehér 2008). En el sistema multietapa de embriones somáticos de *T. domingensis* se cumplieron estas hipótesis al: 1) utilizar un germinado, en el cual las células fueron competentes y genéticamente predeterminadas para expresar embriogénesis. Las células predeterminadas genéticamente son las más ampliamente utilizadas en los protocolos de embriogénesis somática por su potencial embriogénico (Elhiti & Stasolla 2011) y 2) al determinar las condiciones fisiológicas inductivas y permisivas que favorecieron el desarrollo embriogénico en la etapa 0, I y II.

El desarrollo *in vitro* de de embriones generalmente se divide en fase de inducción en la cual la célula somática es reprogramada y fase de desarrollo donde se caracteriza el crecimiento del embrión (Elhiti & Stasolla 2011). Esta fase de

transición o inductiva ha sido difícil de definir, ya que no se conoce por que ciertos genotipos, explantes o células son más amenos al proceso que otras (Elhiti & Stasolla 2011; Fehér 2008)

En la etapa 0, el explante de *T. domingensis* primario formó nódulos celulares en la base caular y las células fueron competentes a la inducción callogénica, Elhiti & Stasolla (2011) y Von Arnold (2008) señalaron a los germinados como uno de los explantes más apropiados para producir embriogénesis directa. En *Passiflora cincinnata* y *Phoenix dactylifera* la presencia de protuberancias descritas como un grupo de células con núcleos grandes y citoplasma densos en alta actividad mitótica (Rocha *et al.* 2011). En los callos producidos la célula embriogénica fue revelada a través de la alta actividad mitótica de grandes células ovaladas, elongadas de citoplasma denso que evolucionaron en crecimiento desorganizado y sin polaridad, hasta la formación de masas proembriogénicas. El crecimiento periclinal y anticlinal del callo que formó los nódulos de tejido meristemático y masas proembriogénicas concuerda con las observaciones histológicas señaladas en la etapa de proembriogénesis de las angiospermas acuáticas emergentes *Oryza zativa* (Vega *et al.* 2009; Mariani *et al.* 2002) y las terrestres *Cocus nucifera* (Azpeitia *et al.* 2009; Saenz *et al.* 2006) y *Musa sp.* (Strosse *et al.* 2003). En la gimnosperma *Picea abies* las masas proembriogénicas se clasifica en tres complejos celulares diferenciados por el número de células vacuoladas y alargadas adyacente a la células citoplásmicas densas (Filonova *et al.* 2000). En la monocotiledónea *T. domingensis* las masa proembriogénicas fueron células citoplásmicas densas rodeadas de células de callo muy similar a otras monocotiledóneas como *Oryza sativa* (Vega *et al.* 2009; Mariani *et al.* 2002) y *Cocus nucifera* (Verdeil *et al.* 2001), y a las dicotiledóneas *Theobroma cacao* (Maximova *et al.* 2002) y *Phoenix dactylifera* (Sané *et al.* 2006). La selección de estas masa proembriogénicas del total de la población por un cribado del cultivo y/o por un gradiente de densidad eleva a un 90% que la población sea embriogénica y relativamente sincrónica en el desarrollo (Zimmerman 1993), en *T. domingensis* no se empleó ningún método selectivo de estructuras por lo que el

sistema presento asincrónica persistente, pero con alta producción de embriones somáticos en $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D (Capítulo 2).

En *T. domingensis* se determinaron cuatro estados de desarrollo del embrión somático los cuales coincidieron con las fases secuenciales globular, oblongo, escutelar y coleptilar de un embrión cigótico en monocotiledóneas (Forestan 2010; Quiroz-Figueroa *et al.* 2006) y con los estados de desarrollo generales reportados por Von Arnold (2008), Quiroz-Figueroa *et al.* (2006), Filonova *et al.* (2000) y Dodeman (1997).

El ESg de *T. domingensis* que derivó de la masa proembriogénica presentó un plano de desarrollo radial compuesto de tres tejidos meristemáticos primarios típicos de un espermatofito (Evert 2006). En las especies modelos *Zea mays* y *Arabidopsis thaliana* se reportaron estados de desarrollo transitorios que no son más que estados de expansión celular más que de diferenciación (Forestan *et al.* 2010; Kim *et al.* 2005). En *Typha domingensis* se ubicó al ESo como un estado de transición entre el embrión somático globular y el embrión somático escutelar (Azcon-Bieto & Talón 2003; Forestan *et al.* 2010). En *O. sativa* este estado transitorio es llamado enlongado (Mariani 2002). La hidrófita emergente *T. domingensis* pertenece al orden de las poales (Tillich 2007) y por lo tanto como todas las especies del orden cuenta con una compleja arquitectura embriogénica. Las angiospermas comparten un mismo patrón de desarrollo embriogénico hasta la etapa de embrión somático globular perteneciente a la embriogénesis temprana (Azcon-Bieto & Talón 2003; Quiroz-Figueroa *et al.* 2006; Fehér *et al.* 2003). En las monocotiledóneas la embriogénesis tardía se caracteriza por su simetría bilateral el cual está determinado por el transporte polar de auxina y por lo tanto el desarrollo de un cotiledón lateral es evidente, que en esta clase se denomina escutelo (Fischer & Neuhaus 1996). La presencia de una estructura cotiledonar en el embrión somático de *T. domingensis* conformado de parénquima de reserva rico en amiloplastos (Azcon-Bieto & Talón 2003) permitió confirmar que el grado de desarrollo alcanzado en los embriones somáticos de *T. domingensis* fue del tipo

escutelar. En embriones somáticos de *Oryza sativa* en la fase escutelar el protodermo se transforma en la epidermis y aparece el haz vascular que indica que está iniciando el siguiente estado de desarrollo (Mariani *et al.* 2002), en *T. domingensis* los embriones somáticos escutelares presentaron en algunos casos ocasionales células prevasculares, lo que puede ser indicativo de que comienza el grado de desarrollo coleoptilar y por lo tanto su subsecuente maduración. En *Typha domingensis* el estudio histológico reveló que el estado coleoptilar fue alcanzado al presentar el coleoptilo y la radícula, no obstante no se pudo observar la coleoriza y la plúmula estructuras básicas de embrión maduro en monocotiledóneas (Forestan *et al.* 2010; Evert 2006). Cambios fisiológicos como la desecación y en muchos casos la quiescencia completan el proceso de formación de la semilla (Azcon-Bieto & Talón 2003; Dodeman 1997) en plantas terrestres, por lo tanto la correlación de las fases de desarrollo específicas del embrión con métodos para la identificación de marcadores moleculares son necesarios para dilucidar la vía embriogénica completa en *T. domingensis* sobre todo en la fase de maduración fisiológica. Al respecto, la proteómica ha ofrecido la posibilidad de recrear una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas en este último estadio fisiológico, por ejemplo a) el estudio de proteínas LEA (late embryogenesis abundant) y su rol en la desecación de semillas ortodoxas (Shih *et al.* 2008), b) el impacto de las proteínas extracelulares endoquitinasas y arabinogalactanos y los oligosacáridos solubles, moléculas involucradas en la cascada de señales que promueven el desarrollo de embriones somáticos (Quiroz-Figueroa *et al.* 2006; Fehér *et al.* 2003) y c) otras proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con el proceso de embriogénesis somática.

Los múltiples patrones de desarrollo del embrión y la asincronía del sistema (Capítulo 2) dificultaron la clasificación de los embriones somáticos de *T. domingensis*. La diversidad morfológica del embrión somático sobre todo en las fases tardías, a causa de la carencia o sobreexpresión de uno o más elementos estructurales que conforman al embrión hicieron factible la distinción de un embrión normal a uno anormal, este último denominado aberrante. Los embriones

anormales o aberrantes son también llamados embrioides y son comunes en embriogénesis somática (Hoenemann *et al.* 2010; Azcon-Bieto & Talón 2003). Estas anomalías morfogénicas están relacionadas con la expresión o supresión de ciertos genes (Hoenemann *et al.* 2010; Dodeman 1997), por ejemplo el gen *GNOM* afecta el plano de división celular y por lo tanto repercuten en eventos tempranos de la morfogénesis de la planta (Dodeman 1997). Una alta producción de embrioides puede repercutir en la reproducibilidad de un protocolo (Hoenemann *et al.* 2010) y por lo tanto ver comprometida las tasas de éxito regenerativo.

El suspensor de *T. domingensis* no solo permitió esclarecer el origen del embrión somático sino además permitió identificar el grado de desarrollo alcanzado. Los embriones somáticos de *T. domingensis* presentaron un suspensor tipo como el cual se fue reduciendo conforme avanzó el desarrollo del embrión. La presencia de esta estructura temporal en el embrión somático determinó el origen unicelular del mismo (Quiroz-Figueroa *et al.* 2006). Esto se debe a que el suspensor en embriogénesis cigótica se origina de una sola célula, la célula basal (Azcon-Bieto & Talón 2003). El suspensor cigótico funge como conducto de nutrientes desde el tejido materno hacia el embrión (Azcon-Bieto & Talón 2003), el suspensor somático tiene la misma función como transporte de nutrientes pero además es una importante fuente de reguladores de crecimiento durante las fases tempranas de la embriogénesis (Dodeman *et al.* 1997; Yeung & Meinke 1993). Por lo tanto la presencia de anomalías tiene un efecto inhibitorio en la transición a estados de desarrollo más tardíos (Dodeman *et al.* 1997; Yeung & Meinke 1993). En la embriogénesis cigótica de especies ortodoxas el suspensor degenera al inicio de la desecación de la semilla y su función la adopta el endospermo, iniciando la fase de dormancia en el embrión maduro (Azcon-Bieto & Talón 2003).

Las condiciones de cultivo *in vitro* en oscuridad o luz es un parámetro promotor de embriones somáticos (D' Onofrio *et al.* 1998). La luz puede afectar al crecimiento y desarrollo de las plantas (Azcon-Bieto & Talón 2003). En *T. domingensis* el factor

ambiental no tuvo efectos significativos en la producción de embriones somáticos (Capítulo 2). En otras monocotiledóneas como *Phalaenopsis amabilis* y *Phalaenopsis Nebula* el régimen de luz mostró efecto en la respuesta embriogénica de explantes de hojas en medio de cultivo con tiadizuron $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ presentó 50% de embriones y 30% de oxidación en oscuridad mientras que los tratamientos con largas duraciones de luz presentaron porcentaje bajos de embrión y oxidación de 60 a 90% al final de un periodo de 60 días (Gow *et al.* 2009). Al parecer en *T. domingensis* la competencia embriogénica parece haber estado más relacionada con la naturaleza del explante que por condiciones ambientales. La condición ambiental mostró respuestas embriogénicas y organogénicas que deben ser más estudiadas.

La diferenciación celular e histogénica expresada en los cultivos de *Typha domingensis* durante la etapa de inducción, proliferación y maduración del embrión somático fue favorablemente descrita en este estudio histológico.

Conclusión General

La optimización de la embriogénesis somática en cultivo multietapas favoreció el desarrollo de embriones somáticos en la hidrófita emergente *Typha domingensis*.

El 2,4-D en la etapa de inducción y expresión embriogénica determinó el proceso de embriogénesis somática. La ausencia de 2,4-D fue importante en la etapa de maduración.

La embriogénesis somática mostró una ruta embriogénica indirecta y unicelular. Aunque las estructuras embriogénicas se formaron asincrónicamente por la falta de homogeneidad del sistema, lo cual puede ser mejorado mediante el tamizado de células y estructuras embriogénicas.

La alta producción de embriones aberrantes puede repercutir en la reproducibilidad del sistema.

Durante la embriogénesis somática de *T. domingensis* el proceso de diferenciación celular y tisular y el grado de madurez de los embriones somáticos, así como la determinación del origen unicelular del mismo, fueron distinguidos con precisión a través del estudio histológico.

Otras alternativas potencialmente embriogénicas que auguran incrementar la factibilidad de un modelo eficiente de embriogénesis somática para esta especie sería el uso de cultivos de células suspendidas iniciadas de los callos, amarillo o blanco. El cultivo de células individualizadas favorece la sincronía celular y aunque representa la ruta embriogénica más larga la frecuencia de los embriones somáticos es elevada.

El conocimiento del modelo de desarrollo embriogénico y colateralmente el rizogénico genera una línea de estudio de reciente interés en el campo de la biotecnología celular y molecular, así mismo este modelo será útil para profundizar en el metabolismo reproductivo o vegetativo de *T. domingensis*.

La interpretación completa del proceso embriogénico puede ser factible con la implementación de estudios de proteómica y metabolómica, transcriptómica y genómica funcional.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Referencias

1. Abu-Ziada ME, Mashaly IA, Abd El-Monem M, Torky M. 2008. Economic potentialities of some aquatic plants growing in north east Nile delya, Egypt. *J Appl sciences*. 8(8): 1395-1405.
2. Alemanno L, Ramos T, Gargadenec A, Andary C, Michaux-Ferriere N. 2003. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Ann Bot*. 92: 613-623.
3. Álvarez A. 2007. Inducción directa de embriones somáticos en la especie sumergida *Vallisneria americana*. [Tesis de Licenciatura en Biología]. [Villahermosa, (Tab)]: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
4. Apfelbaum SI. 1985. Cattail (*Typha* spp.) management. *Nat Area J*. 5(3): 9-17.
5. Arenas P, Scarpa FG. 2003. The consumption of *Typha domingensis* Pers. (Typhaceae) pollen among the ethnic groups of the Gran Chaco, South America. *Econ Bot*. 57(2): 181-188.
6. Auld BA. 1996. Criterios económicos para el desarrollo del manejo de malezas. En: Labrada R, Caseley JC, Parker C, editores. Manejo de malezas para países en desarrollo. Producción y Protección Vegetal 120. Roma: FAO.
7. Azcón-Bieto J, Talón M. 2003. Fundamentos de fisiología vegetal. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
8. Azpeitia MA, Sáenz CL, Chan J, Oropeza SC. 2003. Inducción de embriones somático en explantes de plúmula de cocotero por ácido abscísico y polietilenglicol. *Rev Fitotec Mex*. 26(4): 309-318.
9. Azpeitia MA, Chan J, Sáenz CL, Oropeza SC. 2009. Influencia de la subdivisión del callo embriogénico en la formación de embriones somáticos de cocotero. *Agric Tec Mex*. 35(1): 39-48.
10. Banack SA, Rondón XJ, Díaz-Huamanchumo W. 2004. Indigenous cultivation and conservation of Totora (*Schoenoplectus Californicus*, Cyperaceae) in Peru. *Econ Bot*. 58 (1):11-20.

11. Barciela J, Vieitez AM. 1993. Anatomical Sequence and morphometric analysis during somatic embryogenesis on cultured cotyledon explants of *Camellia japonica* L. *Ann Bot.* 71:395-404.
12. Basso LA, Silva LHP, Fett-Neto AG, Azevedo Jr WF, Moreira IS, Calixto JB, Astolfi Filho S, Santos RR, Soares MBP, Santos DS. 2005. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases. A review. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 100 (6):475-506.
13. Benson EE. 2000. Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? *In Vitro Cell Dev Pl.* 36 (3):163-170.
14. Blanco MA, Castillo R, Sánchez M, Capote I, Nieves N, Gonzales JL. 2003. Relación de las proteínas con la capacidad regenerativa de suspensiones celulares homogéneas en caña de azúcar (*Saccharum sp*), cultivar C P52-43. *Cultivos tropicales.* 24(2):29-33.
15. Brix H, Dyhr-Jensen K, Lorenzen B. 2002. Root-zone acidity and nitrogen source affects *Typha latifolia* L. growth and uptake kinetics of ammonium and nitrate. *J Exp Bot.* 53(379): 2441-2450.
16. Brugnoli E, Boccardi L. 2005. Especies acuáticas invasoras en Latinoamérica: ¿Nuevos indicadores de viejos problemas? *Ambientales.* 29: 17-25.
17. Burris JN, Mann DGJ, Joyce BL, Stewart Jr CN. 2009. An improved tissue culture system for embryogenic callus production and plant regeneration in switchgrass. *Bioenerg Res.* 2:267-274.
18. Cronk JK, Siobhan MF. 2001. *Wetland plants: biology and ecology.* Boca Raton: Lewis Publishers.
19. Czakó M, Feng X, He Y, Gollapudi S, Márton L. 2006: *In vitro* propagation of wetland monocots for phytoremediation. In: Mackova M, Dowling DN, Macek T, editors. *Phytoremediation and rhizoremediation: Theoretical background.* Netherlands: Springer. p. 217 225.

20. D' Onofrio C, Morini S, Bellocchi G. 1998. Effect of light quality on somatic embryogenesis of quince leaves. *Plant cell Tiss Org.* 53(2):91-98.
21. Dan Y. 2008. Biological functions of antioxidants in plant transformation. *In vitro cell. Dev Biol Plant.* 44:149-161.
22. Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J Exp Bot.* 48(313):1493-1509.
23. Dokulil MT, Teubner K. 2011. Eutrophication and climate change: Present situation and future scenarios In: Ansari AA, Singh Gill S, Lanza GR, Rast W, editors. *Eutrophication: causes, consequences and control.* Netherlands: Springer. p.1-16.
24. [ECOred] Red Temática de Ecosistemas ECOred. Primer Coloquio sobre Ecosistemas Costeros en Peligro, 2011. Boletín. [Recuperado el 10 de Junio del 2011]. Disponible en: <http://www.ecored.org.mx/boletin.php?b=99>.
25. Elhiti M, Stasolla C. 2011. The use of zygotic embryos as explants for *in vitro* propagation: An overview. In: Thorpe T, Yeung EC, editors. *Plant embryo culture: Methods and Protocols.* Methods in Molecular Biology. 710. Netherlands: Springer. p.229-255.
26. Erwin KL. 2009. Wetlands and global climate change: the role of wetland restoration in a changing world. *Wetlands Ecol Manage.* 17:71-84
27. Estime L, O'Shea M, Borst M, Gerrity J, Liao S. 2003. Effect of phosphorus concentration on the growth of cattail callus cells. *J Plant Nut.* 26(3):691-707.
28. Evert, RF. 2006. *Esau, Anatomía vegetal: Meristemas, células y tejidos de las plantas: su estructura, función y desarrollo.* 3ra. ed. Barcelona: Omega.
29. Fehér A, Pasternak TP, Dudits D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant cell Tiss Org.* 74:201-228.
30. Fehér A. 2008. The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. *Acta Biol Szeged.* 52(1):53-56.
31. Filonova LH, Bozhkov PV, Von Arnold S. 2000. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J Exp Bot.* 51(343): 249-264.

32. Fischer C, Neuhaus G. 1996. Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. *The Plant Journal*. 9(5):659-669.
33. Forestan C, Meda S, Varotto S. 2010. ZmPIN1-Mediated auxin transport is related to cellular differentiation during maize embryogenesis and endosperm development. *Plant Physiol*. 152:1373–1390.
34. George EF, Davies W. 2008. Effects of the physical environment. In: George EF, Hall MA, Klerk GJD, editors. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Netherlands: Springer. p. 423-465.
35. Gibbs JP. 2000. Wetland loss and biodiversity conservation. *Conserv Biol* 14(1): 314-317.
36. Goebel K. 1933. *Organographie der Pflanzen*. 3th ed. Samenpflanzen: Jena.
37. Gow WP, Chen JT, Chang WC. 2009. Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Physiol Plant*. 31:363–369.
38. Hernández-Piedra G. 2009. Plantas acuáticas emergentes como fuente de biocombustibles. [Tesis de licenciatura en Biología]. [Villahermosa, (Tab)]: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
39. Hershner C, Havens KJ. 2008. Managing invasive aquatic plants in a changing system: strategic consideration of ecosystem services. *Conserv Biol*. 22 (3):544–550
40. Hidalgo JC, Junod JM, Sandoval ME. 2005. Recientes aplicaciones de la depuración de aguas residuales con plantas acuáticas. *Theoría*. 14 (3): 209-222.
41. Hoenemann C, Richardt S, Kruger K, Dzimmer A, Hohe A, Rensing S. 2010. Large impact of the apoplast on somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum* offers possibilities for improved developmental control *in vitro*. *BMC Plant Biology*. doi:10.1186/1471-2229-10-77.
42. Jenik PD, Barton MK. 2005. Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. *Development*. 132:3557-3585.

43. Jimenez VM. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *R Bras Fisiol Veg* 13(2):196-223.
44. Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2008. *Plant systematics: A phylogenetic approach*. 3th. ed. Massachusetts: Sinauer Associates.
45. Junk WJ, Bayley PB, Sparks RE (1989) The flood pulse concept in river-floodplain systems. *Proceedings of the International Large River Symposium* (ed. DP Dodge) Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences. 110-121 pp.
46. Kim I, Kobayashi K, Cho E, Zambryski PC. 2005. Subdomains for transport via plasmodesmata corresponding to the apical–basal axis are established during *Arabidopsis* embryogenesis. *PNAS*. 102 (33): 11945–11950.
47. Kirwan ML, Guntenspergen GR. 2010. Influence of tidal range on the stability of coastal marshland. *J Geophys Res*. 115, F02009, doi: 10.1029/2009JF001400.
48. Kirwan ML, Guntenspergen GR, D'Alpaos A, Morris JT, Mudd SM, Temmerman S. 2010. Limits on the adaptability of coastal marshes to rising sea level. *Geophys Res Lett*. 37, L23401, doi: 10.1029/2010GL045489.
49. Krikorian AD, Simola LK. 1999. Totipotency, somatic embryogenesis. *Physiol Plant* .105: 348 –355.
50. Lauzer D, Dallaire S, Vincent G. 2000. *In vitro* propagation of reed grass by somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org*. 60: 229-234.
51. Li S, Mendelssohn IA, Chen H, Orem WH. 2009. Does sulphate enrichment promote the expansion of *Typha domingensis* (cattail) in the Florida Everglades? *Freshwater Biol*. 54 (9):1909-1923.
52. Linz GM, Homana HJ. 2011. Use of glyphosate for managing invasive cattail (*Typha sp*) to disperse blackbird (Icteridae) roots. *Crop Prot*. 30 (2):98-104.
53. López MV. 2009. Análisis del evento meteorológico relacionado con la inundación de Tabasco de 2007. [Tesis de maestría en Ciencias (Física de

- la Atmosfera)]. [Ciudad Universitaria, (México, D.F.)]: Universidad Nacional Autónoma de México.
54. Lorenzen B, Brix H, Mc Kee KL, Mendelssohn IA, Miao S. 2000. Seed germination of two everglades species, *Cladium jamaicense* and *Typha domingensis*. *Aquat Bot.* 66: 169-180.
55. Lot A, Novelo R, Olvera G, Ramírez-García P. 1999. Catálogo de angiospermas acuáticas de México: hidrófitas estrictas emergentes, sumergidas y flotantes. Cuadernos del Instituto de Biología 33. México: UNAM.
56. Machakova I, Zazimalova E, George EF. 2008. Plant Growth regulators I: Introduction auxins their analogues and inhibitors. In: George EF, Hall MA, Klerk GJD, editors. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Netherlands: Springer. p. 175-204.
57. Mariani TS, Miyake H, Takeoka Y. 2002. Direct somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* L.) structural and developmental patterns. *JMS.* 7 (2):53-56.
58. Máthé C, Hamvas MM, Grigorszky I, Vasas G, Molnár E, Power B, Davey MR, Borbély G. 2000. Plant regeneration from embryogenic cultures of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex steud. *Plant cell Tiss Org.* 63: 81-84.
59. Maximova SN, Alemanno L, Yolng A, Ferriere N, Traore A, Guiltinan M. 2002. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In vitro Cell Dev Biol Plant.* 38: 252-259.
60. Meneses A, Flores D, Muñoz M, Arrieta G, Espinoza AM. 2005. Effect of 2,4-D, hydric stress and light on indica rice (*Oryza sativa*) somatic embryogenesis. *Rev Biol Trop.* 53(3-4):361-368.
61. Miao SL, McCormick PV, Newman S, Rajagopalan S. 2001. Interactive effects of seed availability, water depth, and phosphorus enrichment on cattail colonization in an Everglades wetland. *Wetlands Ecol Manage* 9(1):39-47.

62. Motivans K, S Apfelbaum. 1987. Element stewardship abstract for *Typha* spp., North American cattails. The Nature Conservancy.
63. Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. 15: 473-479.
64. Nandakumar R, Chen L, Rogers SMD. 2005. Agrobacterium-mediated transformation of the wetland monocot *Typha latifolia* L. (Broadleaf cattail). *Plant Cell Rep*. 23:744–750.
65. Nicholls RJ. 2004. Coastal flooding and wetland loss in the 21st century: changes under the SRES climate and socio-economic scenarios. *Global Environ Chang*. 14: 69-86.
66. Niranjan MH, Sudarshana S, Girisha T. 2008. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Nymphoides cristatum*: A medicinally important plant. *Global J Biotech & Biochem*. 3 (2): 79-82.
67. Nishiwaki M, Fujino K, Koda Y, Masuda K, Kikuta Y. 2000. Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. *Planta*. 211:756-759.
68. Novelo A, Ramos L. 2007. Vegetación acuática. En: Bueno J; Álvarez F, Santiago S, editores. Biodiversidad del estado de Tabasco. México: UNAM-CONABIO. p.111-135.
69. Odjegba VJ, Fasidi IO. 2004. Accumulation of trace elements by *Pistia stratiotes*: implications for phytoremediation. *Ecotoxicology*. 13(7):637-646.
70. Oh MJ, Kim SW, Liu IR, Na HR, Choi HK. 2008. High frequency plant regeneration from zygotic-embryo-derived embryogenic cell suspension cultures of watershield (*Brasenia schreber*). *Plant Biotechnol*. 2:87-92
71. Pachauri RK, Reisinger A. 2007. Cambio climático 2007: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Cuarto Informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio climático. Ginebra: IPCC.
72. Paris C, Hadad H, Maine MA, Suñe N. 2005. Eficiencia de dos macrofitas flotantes libres en la absorción de metales pesados. *Limnetica*. 24(3-4): 237-244.

73. Pérez EN, García PJ, Robaina, RR. 2007. Propagación in vitro de *Cymodosea nodosa* para su utilización en la restauración de sebales. Vector Plus. 74-81.
74. Pemberton RW. 2000. Waterblommetjie (*Aponogeton distachyos*, Aponogetonaceae), a recently domesticated aquatic food crop in Cape South Africa with unusual origins. Econ Bot. 54(2): 144-149.
75. Popova AF, Ivanenko GF. 2007. Embryogenesis in *Sium latifolium* L. (Umbeliferae) under different water regimes. Biological. 53 (2): 52-54.
76. Quiroz-Figueroa F, Rojas-Herrera R, Galaz-Avalos R, Loyola-Vargas V. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell Tiss Org. 86:285-30
77. Roca WM, Mroginski LA. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT.
78. Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FAO, Da Silva LC. 2012. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. Protoplasma. 249(3):747-58.
79. Rogers SD, Beech J, Sarma KS. 1998. Shoot regeneration and plant acclimatization of the wetland monocot cattail (*Typha latifolia*). Plant Cell Rep. 18: 71-75.
80. Rogers SMD. 2003. Tissue culture and wetland establishment of the freshwater monocots Carex, Juncus, Scirpus, and Typha. In Vitro Cell Dev Biol Plant. 39(1): 1-5.
81. Rugkhla A, Jones MGK. 1998. Somatic embryogenesis and plantlet formation in *Santalum album* and *S. spicatum*. J Exp Bot. 49(320):563-571
82. Ruiz-Silvera C. 1999. Especies multipropósito en una agricultura sostenible: el caso de las plantas acuáticas *Lemna* y *Azolla*. DANAC. 5(1):1-2.
83. Rzedowski GC, J Rzedowski. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. México: Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
84. Saenz L, Azpeitia A, Chuc-Armendariz B, Chan JL, Verdeil JL, Hocher V, Oropeza C. 2006. Morphological and histological changes during somatic

- embryo formation from coconut plumule explants. In Vitro Cell Dev Pl. 42:19–25.
85. Sandoval EZ. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Cuaderno del instituto de Biología 38. México: UNAM.
86. Sané D, Aberlenc-Bertossi F, Gassama-Dia YK, Sagna M, Trouslot MF, Duval Y, Borgel A. 2006. Histocytological analysis of callogénesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). Ann Bot. 98:301-308.
87. Santa-Catarina C, Silveira V, Balbuena TS, Viana AM, Estelita ME, Handro W, Floh EI. 2006. IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. Plant Growth Regul. 49: 237-247.
88. Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P. 1998. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae. National Renewable Energy Laboratory (NREL) / U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development (DOE). Washington, D.C.
89. Sheoran AS. 2006. A laboratory treatment study of acid mine water of wetlands with emergent macrophyte (*Typha angustata*). Global J Biotech & Biochem. 14 (1):209-222.
90. Shih MD, Hoekstra FA, Hsing, YI. 2008. Late embryogenesis abundant proteins. Advances in Botanical Research. 48:212-255.
91. Skinner K, Wright N, Porter-Goff E. 2007. Mercury uptake and accumulation by four species of aquatic plants. Environ Pollut. 145(1):234-237.
92. Smith SM, Newman S. 2001. Growth of southern cattail (*Typha domingensis* Pers.) seedlings in response to fire related soil transformations in the northern Florida everglades. Wetlands. 21(3):362-369.
93. Sobrero M, Fernández OA, Sabbatini MR. 1993. Seed of germination of *Typha subulata* in relation to weed management. J Aquat Plant Mange. 31:98-100.
94. Stevens M, Hoag C. 2000. Southern cattail, *Typha domingensis* Pers. Guide plant. USDA, NRCS.

95. Strosse H, Domergue R, Panis B, Escalant JV, Cote F. 2003. Suspensiones de células embriogénicas de banano y plátano. Guías técnicas INIBAP 8. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia.
96. Suda K, Shahbazi A, Li Y. 2009. The feasibility of using cattails from constructed wetlands to produce bioethanol. *In* Nzewi E, Reddy G, Luster-Teasly S, Kabadi V, Chang S, Schimmel K, Uzochukwu G. Proceedings of the 2007 National Conference on Environmental Science and Technology. New York: Springer. p.9-15.
97. Tillich H. 2007. Seedling diversity and the homologies of seedling organs in the order Poales (Monocotyledons). *Annals of Botany*. 1:1-17.
98. Touchette BW, Steudler SE. 2009. Climate change, drought and wetland vegetation. Proceedings of the 2007 National Conference on Environmental Science and Technology. 5: 239-244. 1. T'ulbure MG, Johnston CA, Auger DL. 2007. Rapid invasion of a Great Lakes coastal wetland by non-native *Phragmites australis* and *Typha*. *Journal of Great Lakes Research*. 33: 269-279.
99. Vara Prasad MN, De Oliveira FH. 2003. Metal hyperaccumulation in plants: Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electron J Biotechnol*. 6(3): 285-321.
100. Vega R, Vásquez N, Espinoza AM, Gatica AM, Valdez-Melara M. 2009. Histology of somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa*). *Rev Biol Trop*. 57(1):141-150.
101. Verdeil JL, Hocher V, Huet C, Grosdemange F, Escoute J, Ferriere N, Nicole M. 2001. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. *Ann Bot*. 88:9-18.
102. Von Arnold S. 2008. Somatic embryogenesis. *In*: George EF, Hall MA, Klerk GJD, editors. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Netherlands: Springer. p. 335-354.

103. Wang J, Seliskar DM, Gallagher JL. 2007. Growth of tissue culture regenerated salt marsh monocots in a simulated marsh field plot: Implication for wetland creation and restoration. *Ecol Eng.* 29:8-16.
104. Yang Y, Guo Y, Guo Y, Guo Z, Lin J. 2003. Regeneration and large-scale propagation of *Phragmites communis* through somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org.* 75: 287-290.
105. Yeung EC, Meinke DW. 1993. Embryogenesis in angiosperms: Development of the suspensor. *The Plant Cell.* 5:1371-1381.
106. Zedler JB, Kercher S. 2004. Causes and consequences of invasive plants in wetlands: Opportunities, opportunists, and outcomes. *Crit Rev Plant Sci.* 23:431-452.
107. Zimmerman JL. 1993. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell.* 5:1411-1423.
108. Zimmerman R, Werr W. 2005. Pattern formation in the monocot embryo as revealed by NAM and CUC3 orthologues from *Zea mays* L. *Plant Mol Biol.* 58:669-685.

Índice de Tablas y Figuras

Tablas	Página
Capítulo II	
Tabla 2.1.- MANOVA Variación estadística en las respuestas embriogénicas de <i>T. domingensis</i> en tiempos de máxima producción. Interacción = Luz/Oscuridad x 2,4-D.	27
Tabla 2.2 Porcentajes de cultivo con las estructuras embriogénicas sobre el explante y el medio de cultivo.	28
Capítulo III	
Tabla 3.1 ANOVA paramétrico y no paramétrico de las respuestas celulares y embriogénicas de la etapa I con variaciones en la concentración de 2,4-D. (% de cultivos).	44
Tabla 3.2 Porcentajes de cultivo en las estructuras embriogénicas sobre el explante y el medio de cultivo en la etapa I con variaciones en la concentración de 2,4-D.	44
Tabla 3.3. ANOVA paramétrico y ANOVA no paramétrico de las respuestas celulares y embriogénicas en la etapa II (% de cultivos). 2,4-D= Concentración antecedente de la Etapa I.	46
Tabla 3.4 Porcentajes de cultivos de <i>Typha domingensis</i> con estructuras embriogénicas y no embriogénicas sobre el explante y el medio de cultivo en la etapa II. 2,4-D= Concentraciones antecedentes en Etapa I.	47

Tabla 3.5. ANOVA paramétrico y no paramétrico con respuestas organogénicas de los explantes de *Typha domingensis* en las etapas I y II. 2,4-D= Concentraciones antecedentes de la Etapa I. 49

Tabla 3.6 Porcentaje de explantes de *Typha domingensis* con organogénesis de hoja y raíz en la etapa II. 2,4-D= Concentraciones antecedentes de la Etapa I. 49

Capítulo IV

Tabla 4.1. Condiciones experimentales en el proceso de embriogénesis somática de *Typha domingensis*. 59

Figuras

Página

Capítulo II

Figura 2.1. Morfología de *Typha domingensis*. (a): esporofito. (b): inflorescencia estaminada (estrella) y carpelada (circulo). (c): aquenio con perianto. (d): semilla. (e): disección de semilla en testa (estrella) y embrión cigótico (flecha). (c) = 16x y (d) (e) = 32x. 14

Figura 2.2. Germinado *in vitro* de *Typha domingensis* de 9 días de edad. 17
c: cotiledón. hc: hipérfilo cotiledonar. fc: funda cotiledonar. t: testa. f: fanerómero. h: hipocótilo. rp: raíz primaria. rb: raíz del brote axilar. eo: eófilo. 8X.

Figura 2.3 Morfología generada sobre el explante de *Typha domingensis* en la etapa experimental I, sobre el explante (a) (b) (c) (d) y desprendida del explante (e) (f) y (g). (a): Callo amarillo nodular. (b): Callo amarillo nodular con necrosis moderada. (c): callo amarillo nodular con necrosis intensa. (d): Embrión somático. (e): Células suspendidas. (f): Turbidez. 18

(g): Callo amarillo nodular friable. (h): *T. domingensis* de 30 días de edad en oscuridad. (i): *T. domingensis* de 30 días de edad con luz. (a) (b) y (c) =8x y (d) (g) = 16x.

Figura 2.4. Embrión somático sobre callo amarillo nodular. (a): Embrión somático sobre callo amarillo. (b): Detalle de embrión somático. rz: raíz. ca: callo amarillo nodular. caf: callo amarillo friable. col: coleoptilo persistente. te: testa. cs: células suspendidas. s: suspensor. es: embrión somático. (a) =16x 19

Figura 2.5. Cinética de callo amarillo, callo blanco y embrión somático sobre el explante con factores combinados 2.4-D ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y ambiente: a) 0.5 +L, b) 0.5 +O, c) 1.0 +L, d) 1.0 +O, e) 2.0 +L, f) 2.0 +O. L = Luz y O= Oscuridad. Línea sólida con cuadrados = abultamiento, línea discontinua con rombos = callo amarillo, línea punteada con triángulos = callo blanco. Líneas verticales = promedios \pm error estándar 22

Figura 2.6 Cinética en la formación de las células suspendidas, callo amarillo friable y turbidez en el medio de cultivo de *Typha domingensis* con factores combinados 2.4-D ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y ambiente: a) 0.5 +L, b) 0.5 +O, c) 1.0 +L, d) 1.0 +O, e) 2.0 +L, f) 2.0 +O. L = Luz y O= Oscuridad. Línea punteada con triángulos = turbidez, línea sólida con cuadrados = células suspendidas, línea discontinua con rombos = callo friable. Líneas verticales = promedios \pm error estándar. 23

Figura 2.7 Grado de necrosis de los embriones somáticos formados en los cultivos de *Typha domingensis* expuestos en combinación de 2.4-D ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y tipo de ambiente: a) 0.5 +L, b) 0.5 +O, c) 1.0 +L, d) 1.0 +O, e) 2.0 +L, f) 2.0 +O. L = Luz y O= Oscuridad. Línea sólida con cuadrados = embrión somático, línea discontinua con rombos = necrosis. Líneas 24

verticales = promedios \pm error estándar.

Figura 2.8. Mapa destino que ilustra la morfología *in vitro* de *Typha domingensis* a 56 días con diferentes concentraciones de 2,4-D en ambientes de luz y oscuridad 26

Capítulo III




Figura 3.1. Secuencia multietapas del proceso embriogénico de *T. domingensis*. Código de colores: ambiente obscuro  y ambiente con luz . Tiempo en días entre cada subcultivo (). ES= embrión somático. 39

Figura 3.2 Características morfológicas durante la secuencia multietapa de *Typha domingensis* en la etapa 0 (a) (b) (c), en la etapa I (d) (e) (f), en la etapa II (g) (h) (i). (a): Callo amarillo nodular. (b): ES globular. (c): ES cotiledonar. (d): Callo amarillo. (e): Callo necrótico con regeneración de hoja. (f): Callos amarillos y ES globular. (g): Callo necrótico con brotes. (h): Callo amarillo con regeneración de raíz. (i): ES. ES:embrión somático. (a) (d) (e) (g) (h) =8x y (c) e (i) =16x. 43

Figura 3.3 Embriones somáticos formados en los cultivos de *Typha domingensis* por la concentración de 2.4-D (Etapa II). Línea sólida con cuadrados = ES total, línea discontinua con cuadrados color rojo = ES total en el explante, línea discontinua con cuadrados color verde = ES total en el medio de cultivo. ES= embrión somático. Líneas verticales = promedios \pm error estándar. Literales diferentes indican diferencias a $p<0.05$. 48

Figura 3.4 Mapa destino de la vía de desarrollo embriogénica del embrión somático en *Typha domingensis* en sistema multietapas. 50

Capítulo IV

Figura 4.1 Células meristemáticas y embriogénicas en cortes histológicos de callo amarillo de *Typha domingensis*. (a): Secciones transversales de callo amarillo de 28 días. (b): Ampliación de la zona meristemática y embriogénica de callo amarillo (c): Detalles de las células meristemática (d): Detalle de la masa proembriogénica. ZM: Zona meristemática. ZE: Zona embriogénica. CM: Células meristemáticas. CE: Células Embriogénicas. MPE: Masa proembriogénica. Pa: Parénquima. Azul de Toluidina. (a) =100x, (b) =400x, (c) y (d) = 1000x. 62

Figura 4.2 Modelo esquemático del patrón de desarrollo de embriogénesis somática en *Typha domingensis*. Código de colores: amarillo: tejido fundamental, verde: procambium, azul: protodermo y naranja: suspensor. 63

Figura 4.3 Histodiferenciación en los callos de *Typha domingensis*. (a): Sección transversal de callo amarillo de 56 días. (b): Zona de tejidos; meristemático [●], transición [↔] y no embriogénico [▲...▼]. (c): Detalle de zona de transición con actividad meristemática y embriogénica (d): Detalle de células embriogénicas. CM: Células meristemáticas. CE: Células Embriogénicas. MPE: Masa proembriogénica. Pa: Parénquima. ZM: Zona meristemática. Nd: Nódulo. Azul de Toluidina. (a) =100x, (b) =200x, (c) =400x y (d) =1000x. 65

Figura 4.4 Histodiferenciación de embrión somático globular de *Typha domingensis*. (a): Embrión somático globular sobre callo amarillo de 56 días. (b): Sección transversal de embriones somáticos globulares en diferentes grados de desarrollo. (c): Diferenciación de tejidos en embrión somático globular (d): Detalle de células embriogénicas. ESg: Embrión somático globular. MF: Meristemo fundamental. PD: Protodermo. PC: 66

Procambium. S: Suspensor. Hematoxilina-eosina. (a) =10x, (b) =400x, (c) y (d) = 1000x.

Figura 4.5 Histodiferenciación de embrión somático oblongo de *Typha domingensis*. (a): Embrión somático oblongo sobre callo amarillo de 56 días. (b): Sección longitudinal de embrión somático oblongo, suspensor flecha con la letra x [x ←→] y embrión somático oblongo flecha con la letra y [y]. (c): Diferenciación de tejidos en embrión somático oblongo (d): Detalle de células de parénquima reserva y procambium. ESo: Embrión somático oblongo. PC: Procambium. PD: Protoderma. MF: Meristemo fundamental. Par: Parénquima de reserva. Am: Amiloplasto. (a) =5x, (b) =100x, (c) =200x y (d) = 400x.

Figura 4.6 Histodiferenciación del embrión somático escutelar de *Typha domingensis*. (a): Morfología del embrión somático escutelar. (b): Detalle del tejido vascular en la zona apical. (c): Sección longitudinal del embrión somático escutelar, suspensor flecha con la letra x [x ←→] y embrión somático escutelar flecha con la letra y [y]. ESesc: Embrión somático escutelar. ep: Eje procambial. c: cotiledon. Azul de Toluidina. (a) =50x, (b) =400x, (c) =400x.

Figura 4.7 Histodiferenciación del embrión somático coleoptilar de *Typha domingensis*. (a): Morfología de EScol. (b): Sección longitudinal de EScol. (c): Detalle de tejido vascular. (d): Detalle de coleoptilo y radícula en EScol . EScol: Embrión somático coleoptilar. col: coleoptilo. r: radícula. e: embrion. esc: escutelo. Azul de Toluidina. (a) =5x, (b) =200x, (c) =1000x, (d) =400x.

Figura 4.8 Morfología de embriones somáticos de *Typha domingensis* observados en la etapa 0, etapa I y etapa II. (a): Esquema del embrión somático de *Typha angustifolia* (Goebel, 1933). (b): Semilla de *T. domingensis*. (c): Embrión somático escutelar. (d) (e) y (f): Embriones somáticos aberrantes. (b) (c) (d) (e) (f) =10x. 71

Figura 4.9 Comparación del patrón de desarrollo de embriogénesis somática de *Typha domingensis* con *Zea mays* y *Arabidopsis thaliana* especies usadas como modelos de estudio embriológicos. *Arabidopsis thaliana* (dicotiledónea) modificada de Azcon-Bieto & Talón (2003), *Zea mays* (monocotiledónea) modificada de Forestan (2010) y *Typha domingensis* (monocotiledónea). Las ilustraciones no están a escala. e: epicotilo. h: hipocotilo. cp: coleoptilo. cr: coleoriza. p: plúmula. r: radícula. es: escutelo. Código de colores: Amarillo: Tejido fundamental, Verde: procambium y Azul: protodermo. Rosa: cigoto. 72

Anexos

Figura A1.1 Representación esquemática del método general en embriogénesis somática de *T. domingensis*. 102

Figura A2.1 Representación grafica de la preparación de muestras histológicas de estructuras embriogénicas de *T. domingensis*, basada en técnicas convencionales. 103

Figura A3.1 Compilación fotográfica de estructuras embriogénicas de *T. domingensis* derivadas de la Etapa 0. (a): Callo amarillo. (b): Racimo de ES oblongos. (c): ES adheridos al explante (d): ES cotiledonar, en el círculo se muestra el extremo apical. (e): Detalle de el extremo apical de ES cotiledonar. (f): Callo amarillo con regeneración tipo brote, en la esquina superior izquierda se muestra una ampliación de la misma. ES: 104

Figura A3.2 Compilación fotográfica de estructuras embriogénicas de *T. domingensis* derivadas de la Etapa I. (a): Callo amarillo. (b): Callo con necrosis moderada y regeneración de hojas. (c): ES cotiledonar, la flecha señala la prolongación anormal del extremo apical, la cual se muestra a detalle en la esquina superior izquierda. (d): Embrión somático. (e): Embriones somáticos tipo cotiledonar fusionados por el extremo basal. (a) y (b) =16x y (c) (d) (e) = 32x. 105

Figura A3.3 Compilación fotográfica de estructuras embriogénicas de *T. domingensis* derivadas de la Etapa II en Luz. Estructuras derivadas del tratamiento sin 2,4-D, (a): Organogénesis laminar sobre callo necrótico. Estructuras derivadas del tratamiento 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D, (b): Brote sobre callo necrótico. (c): Embrión somático cotiledonar. Estructuras derivadas del tratamiento con 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, (d): Callo con brotes y embrión somático. (e): Callo con brotes y raíz. (f): Callo con brotes y múltiples raíces. Estructuras derivadas del tratamiento 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, (g): Callo con brotes. (h): Embrión somático. (i): Callo. (a) y (b) =8x y (c) hasta (i) = 32x. 105

Figura A3.4 Compilación fotográfica de estructuras embriogénicas de *T. domingensis* derivadas de la etapa II en Oscuridad. Estructuras derivadas del tratamiento 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D, (a): Callo necrótico. (b): Callo necrótico y raíces. (c): Callo blanco y raíces. Estructuras derivadas del tratamiento con 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, (d) (e) y (f) Callo blanco con raíces. Estructuras derivadas del tratamiento 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, (g) Callo necrótico y raíces. (h): Callo necrótico con alta producción de raíces. Estructuras derivadas del tratamiento sin 2,4-D, (i): Organogénesis de hoja clorótica y raíz sobre callo necrótico. (a) hasta (i) =32x. 106

Anexo 1

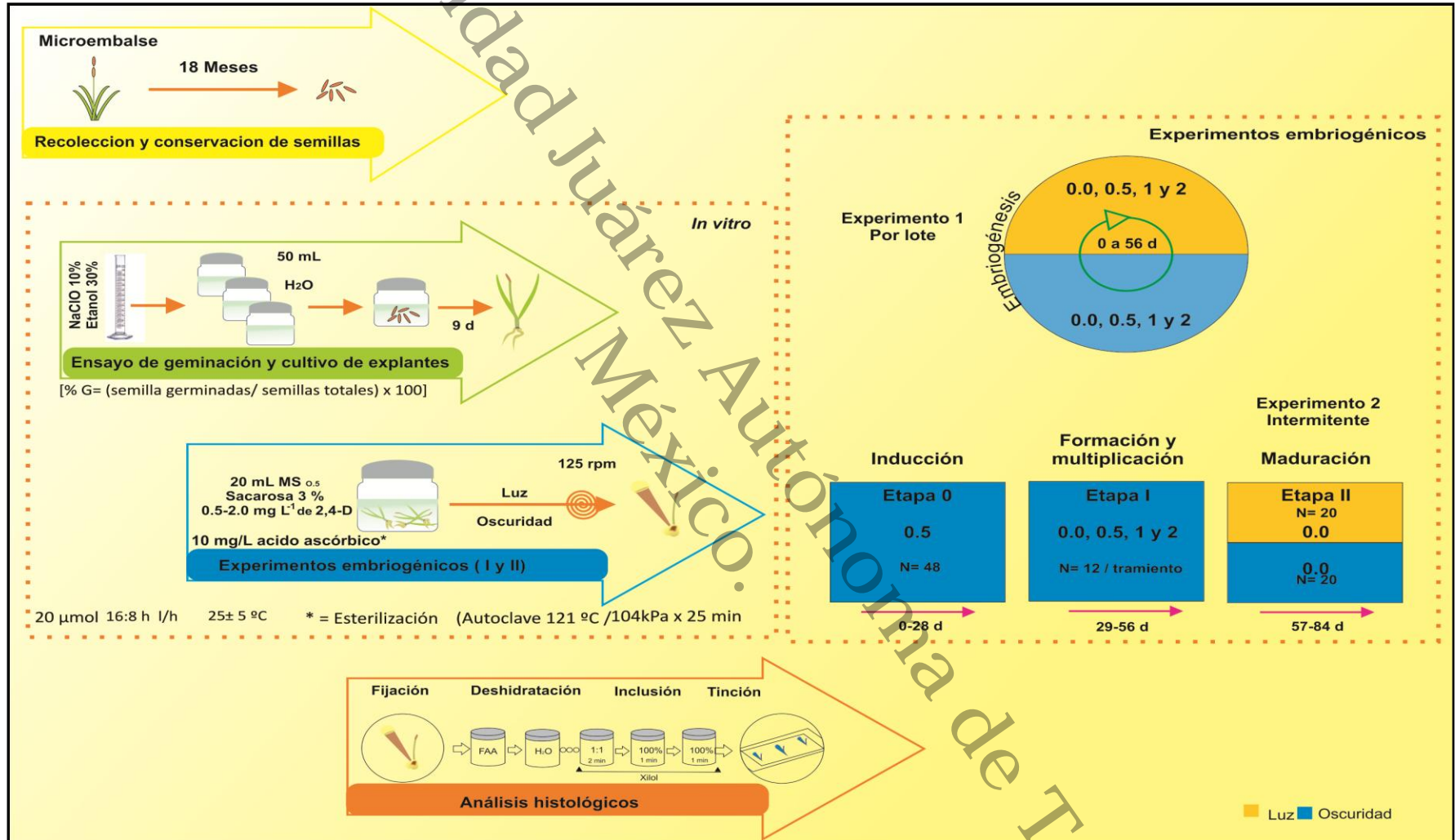


Figura A1.1 Representación esquemática del método general en embriogénesis somática de *T. domingensis*.

Anexo 2

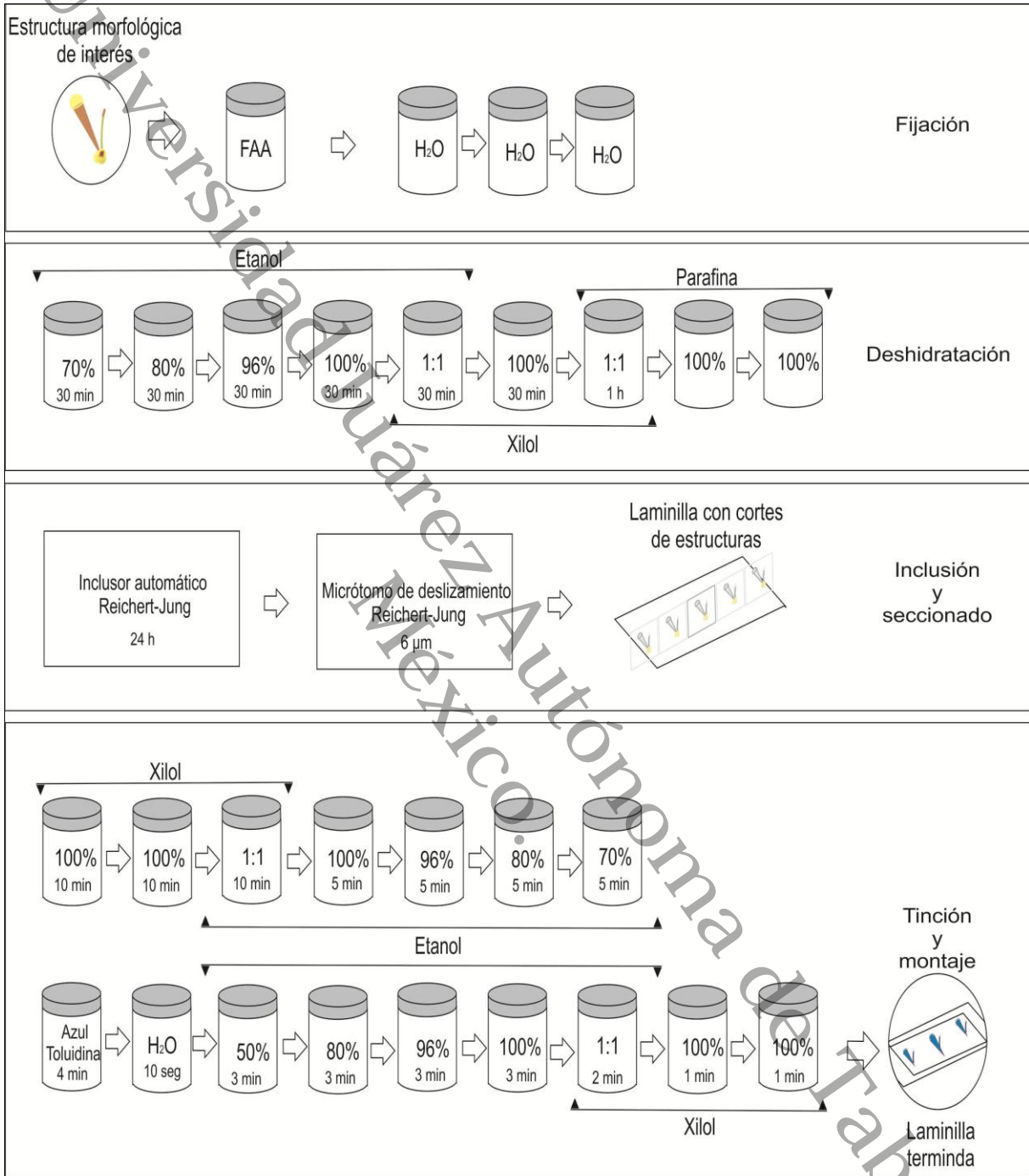


Figura A2.1 Representación grafica de la preparación de muestras histológicas de estructuras embriogénicas de *T. domingensis*, basada en técnicas convencionales.

Anexo 3

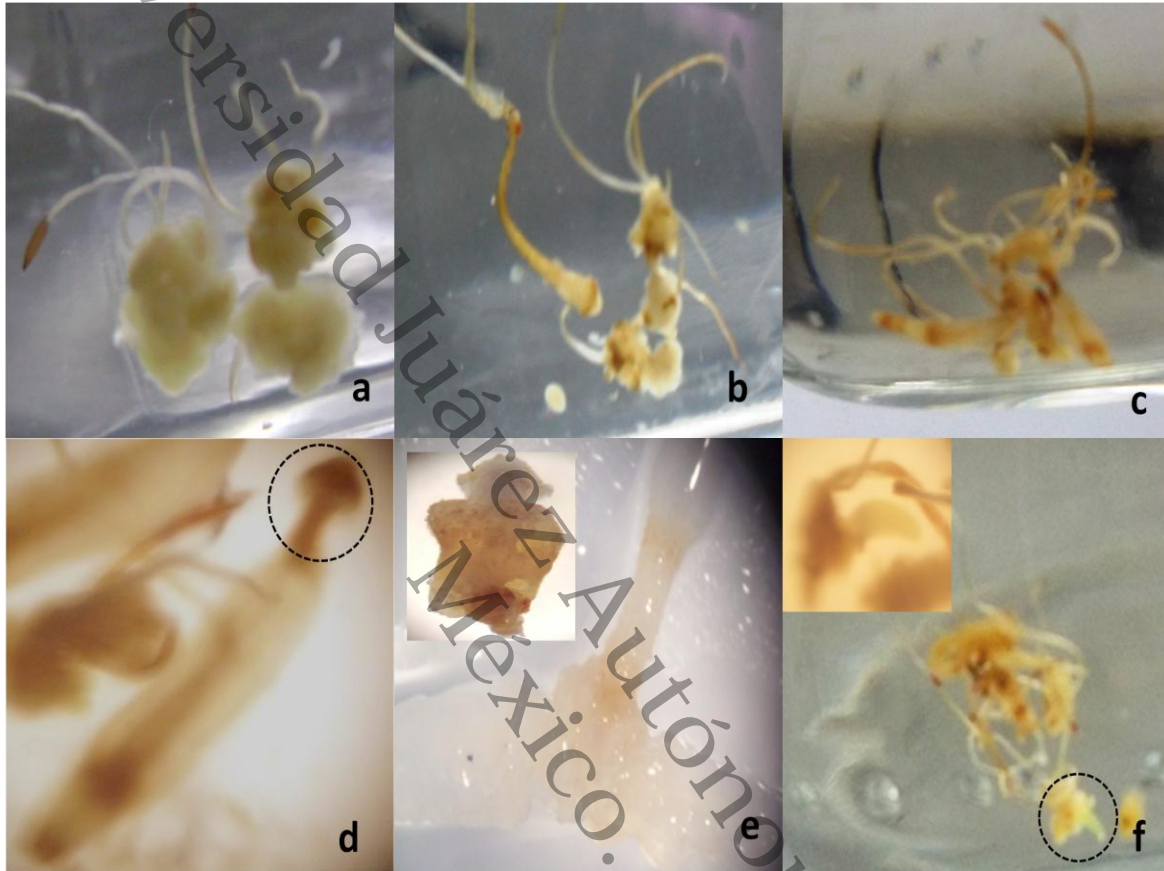


Figura A3.1 Compilación fotográfica de estructuras embriónicas de *T. domingensis* derivadas de la Etapa 0. (a): Callo amarillo. (b): Racimo de ES oblongos. (c): ES adheridos al explante (d): ES cotiledonar, en el círculo se muestra el extremo apical. (e): Detalle de el extremo apical de ES cotiledonar. (f): Callo amarillo con regeneración tipo brote, en la esquina superior izquierda se muestra una ampliación de la misma. ES: Embrión somático. (b) y (c) =16x



Figura A3.2 Compilación fotográfica de estructuras embriogénicas de *T. domingensis* derivadas de la Etapa I. (a): Callo amarillo. (b): Callo con necrosis moderada y regeneración de hojas. (c): ES cotiledonar, la flecha señala la prolongación anormal del extremo apical, la cual se muestra a detalle en la esquina superior izquierda. (d): Embrión somático. (e): Embriones somáticos tipo cotiledonar fusionados por el extremo basal. (a) y (b) =16x y (c) (d) (e) = 32x.

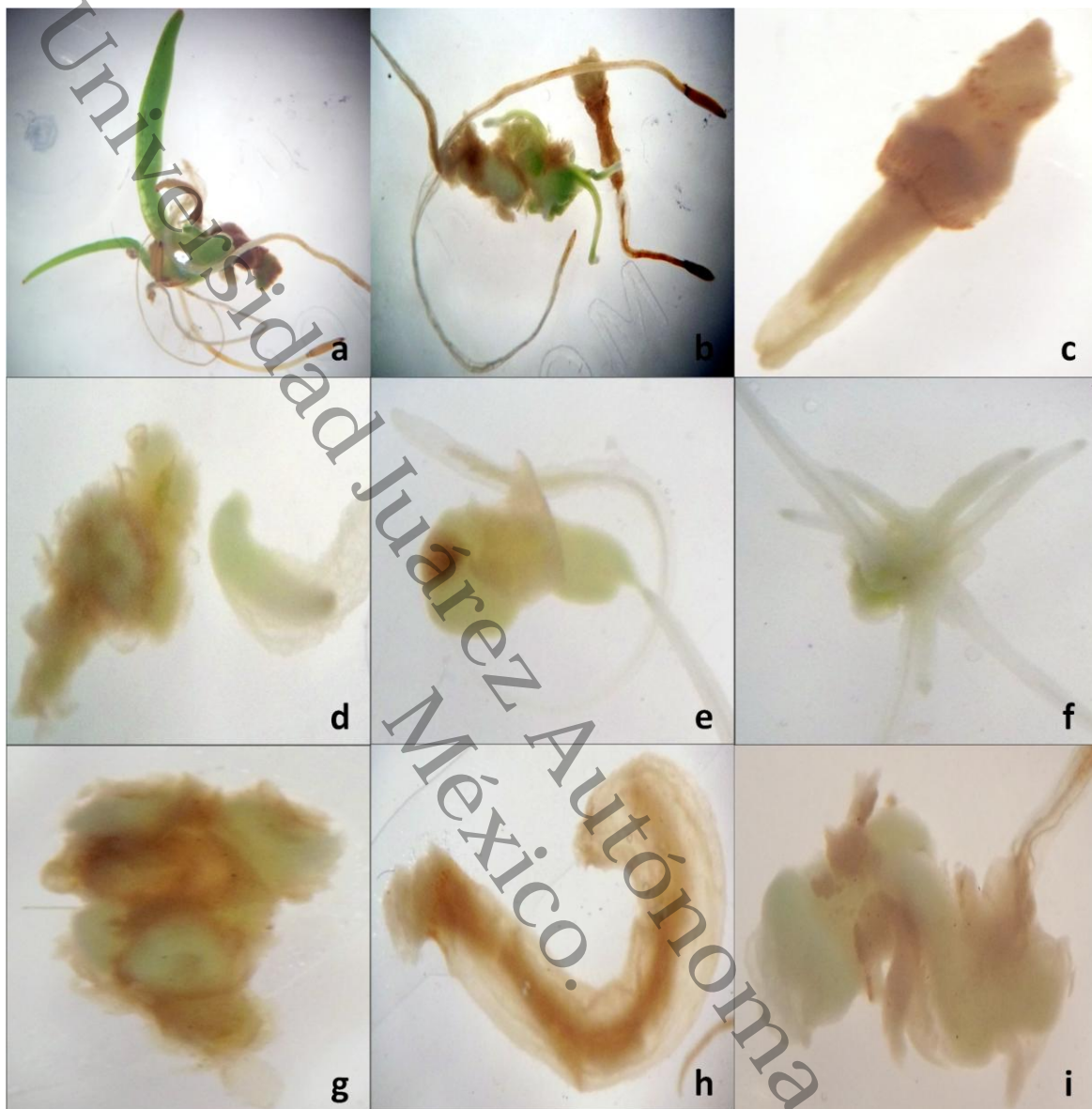


Figura A3.3 Compilación fotográfica de estructuras embriogénicas de *T. domingensis* derivadas de la Etapa II en Luz. Estructuras derivadas del tratamiento sin 2,4-D, (a): Organogénesis laminar sobre callo necrótico. Estructuras derivadas del tratamiento 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D, (b): Brote sobre callo necrótico. (c): Embrión somático cotiledonar. Estructuras derivadas del tratamiento con 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, (d): Callo con brotes y embrión somático. (e): Callo con brotes y raíz. (f): Callo con brotes y múltiples raíces. Estructuras derivadas del tratamiento 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, (g): Callo con brotes. (h): Embrión somático. (i): Callo. (a) y (b) =8x y (c) hasta (i) = 32x.



Figura A3.4 Compilación fotográfica de estructuras embriogénicas de *T. domingensis* derivadas de la etapa II en Oscuridad. Estructuras derivadas del tratamiento 0.5 mg L^{-1} de 2,4-D, (a): Callo necrótico. (b): Callo necrótico y raíces. (c): Callo blanco y raíces. Estructuras derivadas del tratamiento con 1 mg L^{-1} de 2,4-D, (d) (e) y (f) Callo blanco con raíces. Estructuras derivadas del tratamiento 2 mg L^{-1} de 2,4-D, (g) Callo necrótico y raíces. (h): Callo necrótico con hiperproducción de raíces. Estructuras derivadas del tratamiento sin 2,4-D, (i): Organogénesis de hoja clorótica y raíz sobre callo necrótico. (a) hasta (i) =32x.