

# MAESTRÍA EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE  
CARBONO SOBRE LA CAPACIDAD FOTOSINTÉTICA  
DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE  
*Tagetes erecta*

Tesis para obtener el grado de Maestría  
en Ciencias presentada por:

Biol. Elizabeth Hernández Domínguez

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2000





A mis padres, hermanos por todo su comprensión, apoyo y amor, en el desarrollo de esta tesis.

Así como a todos mis amigos y Compañeros por la amistad brindada.

Nuestras horas son minutos  
cuando esperamos saber,  
y siglos cuando sabemos  
lo que se puede aprender.  
Antonio Machado



## Agradecimientos

Este trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Jorge M. Santamaría Fernández, a quien agradezco el apoyo que me brindó para la realización de esta tesis.

Además mi agradecimiento especial a los miembros de mi Comité, los Drs. Brian Maust, Carlos Trejo, Alejandro Castellanos y Victor Loyola Vargas, por sus comentarios que enriquecieron este trabajo.

Al grupo de trabajo de fisiología vegetal de esta área, especialmente a Adriana Quiroz Moreno por su apoyo al inicio de esta tesis, Julián Cuello Cuello por su asesoría en el manejo de diferentes técnicas de cultivo *in vitro*, Margarita Aguilar Espinosa por su colaboración en la siembra del material biológico, Carlos Talavera May y Francisco Espada y Gil por su ayuda en las técnicas de mediciones de fotosíntesis mediante la utilización del IRGA.

Finalmente a todas las personas que de alguna manera participaron en el desarrollo de este trabajo.



## ABREVIATURAS COMUNMENTE USADAS

|                  |                                              |
|------------------|----------------------------------------------|
| PEPc             | Fosfoenolpiruvato carboxilasa                |
| Rubisco          | Ribulosa-1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa |
| PAR              | Radiación fotosintéticamente activa          |
| CO <sub>2</sub>  | Dióxido de carbono                           |
| PN               | Fotosíntesis neta                            |
| RuBP             | Ribulosa 1,5 bifosfato                       |
| IRGA             | Analizador de gases por infrarrojo           |
| PS               | Peso seco                                    |
| PF               | Peso fresco                                  |
| Mg <sup>+2</sup> | Magnesio                                     |
| Pi               | Fósforo inorgánico                           |



# Contenido

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumen                                                                                                                                                      | 1  |
| Summary                                                                                                                                                      | 3  |
| Introducción                                                                                                                                                 | 5  |
| <b>Capítulo 1</b> Antecedentes                                                                                                                               | 9  |
| Micropropagación                                                                                                                                             | 9  |
| Etapas de la micropropagación                                                                                                                                | 9  |
| Ventajas y desventajas de la micropropagación                                                                                                                | 11 |
| Comparación de las condiciones ambientales en plantas cultivadas <i>in vitro</i> y campo                                                                     | 12 |
| Los carbohidratos en el cultivo de tejidos vegetales                                                                                                         | 14 |
| Inducción de la fotoautotrófica en cultivos <i>in vitro</i> de plantas micropropagadas                                                                       | 18 |
| Modelo de estudio: <b><i>Tagetes erecta</i></b>                                                                                                              | 19 |
| Hipótesis                                                                                                                                                    | 21 |
| Objetivos generales                                                                                                                                          | 21 |
| Objetivos específicos                                                                                                                                        | 21 |
| <b>Capítulo 2</b> Efecto de diferentes fuentes de carbono y concentración, sobre la capacidad fotoautotrófica <i>in vitro</i> de plantas de <i>T. erecta</i> | 26 |
| Introducción                                                                                                                                                 | 26 |
| Materiales y Métodos                                                                                                                                         | 30 |
| Resultados                                                                                                                                                   | 39 |
| Discusión                                                                                                                                                    | 62 |
| <b>Capítulo 3</b> Discusión, conclusiones generales y perspectivas                                                                                           | 78 |
| Anexos                                                                                                                                                       | 88 |





## Listado de fotografías

*Foto 1.* Observación del crecimiento y desarrollo en plantas de *Tagetes erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa al 3 y 1.5%, después de ser cultivadas durante 21 días.

*Foto 2.* Observación del crecimiento y desarrollo de hojas en plantas de *Tagetes erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa al 3 % (A) y 1.5% (B), después de ser cultivadas durante 21 días.

*Foto 3.* Observación del crecimiento de raíces en plantas de *Tagetes erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa al 3% (A) y 1.5% (B), después de ser cultivadas durante 21 días.

*Foto 4.* Observación del crecimiento y desarrollo en plantas de *Tagetes erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa al 3 % (A), glucosa al 3% (B) y fructosa al 3% (C) después de ser cultivadas durante 21 días.

*Foto 5.* Observación del crecimiento y desarrollo de hojas en plantas de *Tagetes erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa al 3% (A), glucosa al 3% (B) y fructosa al 3% (C) después de ser cultivadas durante 21 días.

*Foto 6.* Observación del crecimiento de raíces en plantas de *Tagetes erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa al 3%, glucosa al 3% y fructosa al 3% después de ser cultivadas durante 21 días.



## RESUMEN

Se estudió el efecto de modificar la concentración y tipo de fuente carbonada del medio sobre la capacidad fotoautotrófica de plantas de *Tagetes erecta*. Es decir, se estudió el efecto de reducir la concentración de sacarosa de 3% al 1.5% o sustituir con fructosa 3% o glucosa 3%, en la capacidad autotrófica. El objetivo, a largo plazo es obtener un 100% de sobrevivencia, mejor calidad de plantas y un establecimiento más rápido al momento de la transferencia a condiciones *ex vitro*.

Las semillas de *T. erecta* fueron germinadas *in vitro* y cultivadas posteriormente en medio MS, sin sacarosa o con diferentes fuentes de carbono (sacarosa, glucosa y fructosa al 1.5 y 3%).

Se determinó que las plantas cultivadas específicamente con sacarosa, mostraron una baja actividad de Rubisco (enzima que fija el CO<sub>2</sub>) y una actividad elevada de PEPc.

Al reemplazar esta fuente de carbono por glucosa o fructosa, la actividad de Rubisco aumentó hasta valores similares a los reportados en las plantas cultivadas en campo. La actividad de PEPc sólo disminuyó en las plantas cultivadas con sacarosa al 1.5%. Sin embargo, en plantas cultivadas con sacarosa, glucosa y fructosa al 3%, la actividad de PEPc siguió elevada.

El contenido de proteínas disminuyó en las vitroplantas cultivadas con sacarosa, glucosa y fructosa al 3% en comparación con los niveles presentados en las plantas de campo. En cambio, las vitroplantas cultivadas con sacarosa al 1.5% presentaron un contenido elevado de proteínas, similar al mostrado en plantas de campo.

Se realizaron curvas de respuesta a luz; las plantas cultivadas con sacarosa al 3%, presentaron las mayores tasas de respiración en oscuridad que el resto de los tratamientos. A la intensidad de luz equivalente a los cuartos de crecimiento (60  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) las plantas cultivadas en presencia de sacarosa al 1.5% ya mostraban tasas de fijación de CO<sub>2</sub> positivas y de hecho mayores que los demás tratamientos, mientras que las plantas cultivadas en 3% de sacarosa presentaron todavía tasas netas de fijación de CO<sub>2</sub> negativas. A intensidades de luz saturantes, todos los tratamientos presentaron tasas elevadas de asimilación de CO<sub>2</sub>. Las plantas cultivadas con glucosa y fructosa presentaron los valores más elevados en la asimilación de CO<sub>2</sub>. Además, las plantas en presencia de glucosa mostraron el mayor aumento en crecimiento y desarrollo.

Se concluye que la capacidad autotrófica de las plantas de *T. erecta* se ve inhibida por elevadas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo. En tanto, una disminución (al 1.5%) de sacarosa, así como la sustitución de la misma por fuentes de carbono alternativas (glucosa o fructosa) al 3% aumenta la capacidad autotrófica de las vitroplantas de *T. erecta*.

Sin embargo, falta comprobar que dicho aumento en la capacidad autotrófica representa una ventaja en la sobrevivencia, calidad y establecimiento en campo de éstas plantas.



## SUMMARY

Sugar type concentration in the *in vitro* culture medium were modified in order to study their effect on the photosynthetic capacity of medium in plants of *Tagetes erecta* plants. The sucrose concentration was decreased from 3% to 1.5% or substituted with 3% fructose or 3% glucose, with the purpose of inducing autotrophic growth. The long-term objectives, were to improve survival and obtain better quality plants with faster establishment to *ex vitro* conditions.

Seeds of *T. erecta* were germinated *in vitro* and cultivated in medium that contained Murashige and Skoog salts with vitamins, and containing no sugar or sucrose, glucose or fructose (1.5 or 3%).

Plants cultivated with sucrose exhibited low Rubisco activity (enzyme that fixes CO<sub>2</sub>). Replacing sucrose with glucose or fructose, increased the activity of Rubisco to values similar to activity of plants cultivated in the field.

Plants cultivated with 3% sucrose, glucose or fructose exhibited high PEPc activities; however, PEPc activity decreased in plants grown with 1.5% sucrose.

The protein content of vitroplants was low in comparison with field plants, irrespective of whether they were grown with 3% sucrose, glucose or fructose. On the other hand, vitroplants cultivated with 1.5% sucrose exhibited a higher content of proteins, similar to that of field plants.

Light intensity response curves were measured. Plants cultivated with 3% sucrose presented high dark respiration rates. At a light intensity similar to that of the cultivation rooms (60  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), plants cultivated with 1.5% sucrose exhibited positive rates of CO<sub>2</sub> exchange, while plants cultivated in 3% sucrose exhibited negative rates of CO<sub>2</sub> exchange. At saturating light intensity, plants cultivated with glucose and fructose exhibited the highest rates of CO<sub>2</sub> assimilation. Also, plants cultivated in glucose showed the largest increase in growth and development.

In conclusion the autotrophic capacity of the vitroplants of *T. erecta* was inhibited by 3% sucrose concentrations in the culture medium. A decrease in sucrose concentration (to 1.5%), or substitution of 3% sucrose by 3% glucose or 3% fructose increased the autotrophic capacity of the vitroplants of *T. erecta*.

However, it remains to be demonstrated that the autotrophic capacity represents an advantage in the survival, quality and establishment of the plants in the field.



## Introducción

La micropropagación es la producción asexual de las plantas genéticamente uniformes que se originan de un único individuo (Schaeffer, 1990). Por lo tanto, esta técnica involucra la propagación de estas plantas en un medio ambiente artificial y controlado, usando contenedores de cultivo bajo condiciones asépticas y con un medio nutritivo definido (Pierik y Sutter, 1987; Schaeffer, 1990).

La micropropagación tiene diversas ventajas sobre la propagación vegetal y su comercialización, se ha orientado básicamente a la horticultura, agricultura y forestal.

Estas técnicas de cultivo *in vitro* se han utilizado ampliamente en:

- a). Producción de plantas libres de enfermedades
- b). Conservación de genotipos
- c). Mejoramiento de plantas
- d). Producción de metabolitos secundarios
- e). Obtención de un gran número de plantas en tiempos relativamente cortos y con una uniformidad genética.

La micropropagación de muchas especies de plantas se realiza a través del establecimiento de las plántulas, iniciando su crecimiento y desarrollo *in vitro*, seguido del trasplante a invernadero o campo (Pospíšilova *et al*, 1992).

Sin embargo, esta micropropagación en algunas especies se encuentra limitado por una pobre o baja capacidad de estas plántulas cultivadas *in vitro* a establecerse en invernadero o campo. Asociada principalmente a las condiciones ambientales que prevalecen durante su desarrollo y crecimiento *in vitro* (Tabla 0).

| Condición ambiental            | <i>In Vitro</i>                                                                   | <i>Ex vitro</i>                                                                               |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Intensidad de luz              | Baja ( $60-250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) estable (con sin fotoperiodo) | Elevada ( $800-2000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) frecuencia variable, con fotoperiodo |
| Humedad relativa               | Elevada (90-100%) estable                                                         | Baja (30-60%) variable                                                                        |
| Concentración de $\text{CO}_2$ | Variable (2% de la concentración)                                                 | Estable (0.03%)                                                                               |
| Potencial hídrico del medio    | Usualmente bajo, dependiendo de la concentración de carbohidratos                 | Usualmente elevado                                                                            |
| Sacarosa                       | Usualmente presente                                                               | No                                                                                            |

Tabla 0. Comparación de las diferentes condiciones ambientales, típicas de las plantas cultivadas *in vitro* y campo.

Dichas condiciones del ambiente *in vitro* producen un intercambio de gases inadecuado en los contenedores de cultivo (Desjardins *et al.*, 1987), induciendo estomas anormales y poco funcionales (Brained *et al.*, 1987; Santamaría *et al.*, 1994).

Por otra parte la presencia de carbohidratos en el medio de cultivo (Langford y Wainwright, 1988) induciendo un crecimiento de la planta bajo condiciones fotomixotróficas que provocan baja capacidad fotosintética de las plántulas cultivadas *in vitro*.

En cultivo *in vitro*, el crecimiento de estas plantas cultivadas bajo estas condiciones es normalmente sostenido por el suplemento de carbohidratos exógenos (hetero-mixotrófico) al medio cultivo, siendo la fuente de energía por un lado y suministro de esqueletos carbonados para los diferentes procesos de biosíntesis por otro lado (Lipavská y Vreughenhil, 1996).

Se han utilizado diversas fuentes de carbono en los protocolos de micropropagación, dependiendo de la especie. Sin embargo, la sacarosa ha sido considerada como una de las principales fuentes de carbono en el cultivo de tejidos.

En rosas micropropagadas (*Rosa multiflora* L. cv. Montse) se encontró que la capacidad fotosintética disminuyó como consecuencia de la elevadas concentración de sacarosa en el medio de cultivo (Capellades *et al.*, 1991).

Similares efectos sobre la eficiencia fotosintética han sido observados en *Fragaria x ananassa* Duch cv. Kent, *Brassica oleracea* cv. Currawong, y *Chrysanthemum morifolium* Ram cv. Pennine (Short *et al.*, 1987), debido a la presencia de elevadas concentraciones de este carbohidrato en el medio de cultivo.

Otros estudios, como por ejemplo en *Clematis* "The President", las plántulas cultivadas *in vitro* en un medio con sacarosa al 3%, presentaron una baja capacidad fotosintética en comparación con las plantas cultivadas en campo (Lees *et al.*, 1991).

Sharkey (1990) ha sugerido que la actividad enzimática de Ribulosa-1,5-Bisfosfato Carboxilasa/Oxigenasa (Rubisco) que se encarga de fijar CO<sub>2</sub> atmosférico en plantas de campo, es el principal componente inhibido.

Recientes estudio realizados por Hdider y Desjardins, 1994 mostraron un similar efecto negativo sobre la eficiencia de Rubisco, cuando las plantas se cultivaron con elevadas concentraciones de sacarosa.

El efecto inhibitorio en la capacidad fotosintética *in vitro* por la presencia de sacarosa en el medio de cultivo (Stitt *et al.*, 1987; Lees *et al.*, 1991), fue demostrado en los experimentos realizados por Lees y colaboradores en 1991, cuando en el medio, en donde se cultivaron plántulas de *Clematis* se reemplazó la sacarosa por glucosa, resultando en una reducción de este efecto inhibitorio. Las plantas cultivadas con glucosa al 3% exhibieron un aumento en los niveles fotosintéticos en comparación con las plantas cultivadas con sacarosa al 3% (Lees *et al.*, 1991).

En la presente tesis, tomando como base estos antecedentes se pretende evaluar, si la sustitución de sacarosa por glucosa y fructosa tienen un efecto positivo sobre la capacidad fotosintética de plántulas micropropagadas de *Tagetes erecta*.



## BIBLIOGRAFIA

- Brained KE, Fuchigami LH, Kwiatkowski S, Clark CS** (1981). Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured "Pixy" plum growth under different environments. *Horti. Sci.* **16**, 173-175.
- Capellades M, Lemeur R, Debergh P** (1991). Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa cultured in vitro*. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* **25**, 21-26.
- Desjardins Y** (1995). Factors affecting CO<sub>2</sub> fixation in striving to optimize photoautotrophy in micropropagated plantlets. *Plant Tiss. Cult. Biotech.* **1**, 13-25.
- Hdider C, Desjardins Y** (1994). Changes in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and phosphoenolpyruvate carboxylase activities and <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fixation during the rooting of strawberry shoots *in vitro*. *Can. J. of Plant Sci.* **74**, 827-831.
- Hdider C, Desjardins Y** (1995). Reduction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase efficiency by the presence of sucrose during the tissue culture of strawberry plantlets. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* **31**, 165-170.
- Kozai T** (1991). Photoautotrophic micropropagation. *In vitro Cell. Dev. Biol.* **27**, 47-51.
- Kramer PJ** (1980). Adaptation of plants to water and high temperature stress. John Wiley and Sons, New York, p 7.
- Langford PJ, Wainright H** (1988). Effect of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. *Ann. of Bot.* **60**, 633-640.
- Lees RP, Evans EH, Nicholas JR** (1991). Photosynthesis in *Clematis*, "The president", during growth *in vitro* and subsequent *in vitro* acclimatization. *J. Exp. Bot.* **238**, 605-610.
- Lipavská H, Vreugdenhil D** (1996). Uptake of mannitol from the media by *in vitro* grown plants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **45**, 103-107.
- Pierik JE, Sutter EG** (1987). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh P, Zimmerman RH (Eds), *Micropropagation Technology and Application*. Dordrecht. Kluwer Academic. 71-93.
- Santamaría JM, Davies WJ, Atkinson J** (1993). Stomata of micropropagated Delphinium plants respond to ABA, CO<sub>2</sub>, light and water potential, but fail to close fully. *J. Exp. Bot.* **44**, 99-107.
- Schaeffer WI** (1991). Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *In vitro, Cell Dev. Bio.* **26**, 97-101.
- Sharkey TD** (1990). Feedback limitation of photosynthesis and physiological role of ribulose bisphosphate carbamylation. *Bot. Mag. Tokyo.* **2**, 87-105.
- Short KC, Warburton J, Roberts AV** (1987). *In vitro* hardening of cultured cauliflower and Chrysanthemum plantlets to humidity. *Acta Hort.* **212**, 329-334.

**Stitt M, Huber SC, Kerr P** (1987). Control of photosynthetic sucrose formation. In *The Biochemistry of plants*, Vol. 10, Photosynthesis. Eds M. D. Hatch and NK Boardman. Academic Press, New Yorks. p.327-409.

# CAPITULO 1

## Antecedentes

### MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación, propagación por cultivo de tejidos y propagación *in vitro* son sinónimos de una técnica, que se utiliza con el fin de aumentar el número de individuos en condiciones artificiales y asépticas, con nutrición, luminosidad y temperatura controladas. En general, son denominadas técnicas *in vitro* porque los cultivos están contenidos en recipientes de vidrio o plásticos transparentes (Beelen, 1984).

La técnica consiste en la multiplicación asexual de pequeños propágulos, la cual ha demostrado su utilidad práctica en especies de reproducción deficiente o relativamente lenta (orquídeas, agaves, cactáceas, etc.) y en plantas que, aunque sean fácilmente propagables asexualmente, su número incrementa en mayor cantidad en el cultivo *in vitro* en comparación con los métodos tradicionales de esqueje, estolón y bulbo. También se le utiliza en el caso de plantas que poseen un valor agregado como es el caso de las plantas de follaje y ornamentales.

Además, la utilización sistemática de esta técnica para fines comerciales, también se ha enfocado hacia la uniformidad genética del material de siembra cuando el inoculo asexual está ya diferenciado (ápices, yemas axilares, ramas, brotes, etc.), evitándose la variación genotípica propia de las poblaciones generadas por semilla, así como la obtención de material de siembra de alta calidad fitosanitario.

### ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

Durante la multiplicación de una planta por medio de la micropropagación se distinguen las siguientes etapas (Murashige, 1974; Sutter y Langhans, 1980; Debergh *et al.*, 1981) (*Esquema 1*)

#### a) ETAPA 0 (Selección y preparación de la planta madre).

Es aquí, donde se debe dar una especial atención a la selección de la planta madre, la cual debe ser la más vigorosa y libre de enfermedades, además de ser la más típica de la variedad. Es conveniente esterilizar la planta o parte de ésta, con el fin de reducir los niveles de contaminación y favorecer la multiplicación *in vitro*.

#### b) ETAPA 1(Inducción).

En esta etapa se determinan las condiciones de cultivo adecuadas para inducir y desarrollar el explante.

c). ETAPA 2 (Multiplicación).

Los propágulos inducidos en la primera etapa son multiplicados para aumentar el número de plantas que se deriven de una sola planta madre. Este proceso se puede repetir varias veces.

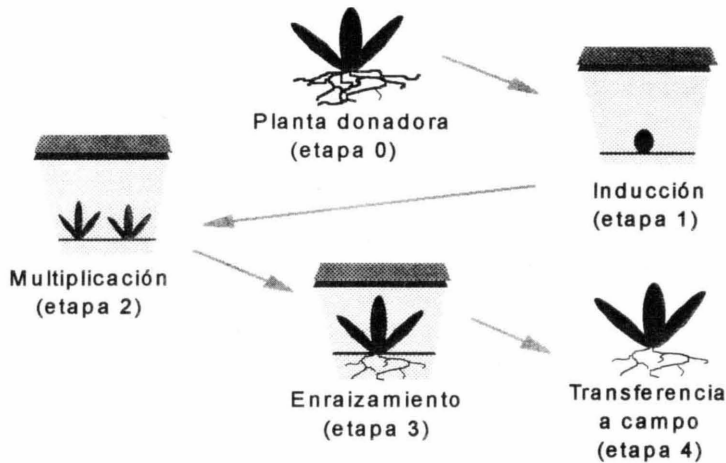
d). ETAPA 3 (Enraizamiento).

Los propágulos derivados de la etapa 2 son pequeños, por lo tanto en esta etapa, se promueve un mayor crecimiento individual, un aumento en su capacidad fotosintética y se elimina el suplemento de carbohidratos. El enraizamiento de estos propágulos es una parte muy importante que se lleva a cabo en esta etapa.

e). ETAPA 4 (Transferencia a campo).

En esta última etapa es cuando las plantas son transferidas de condiciones *in vitro* a campo. Es durante esta transferencia al campo en la que se presentan los problemas más severos en el proceso de micropropagación y en la que ocurren las mayores pérdidas debido a que las plantas no toleran el cambio en las condiciones ambientales. Esto implica una fase más larga de adaptación, en invernadero con cuidados especiales como: riego por nebulización, intensidad de luz y temperatura controladas, lo que eleva el costo de producción. Esto es principalmente por dos razones: las plantas fueron cultivadas en alta humedad relativa y intensidad de luz baja (PAR); el resultado de esto, es una reducción en la cantidad de ceras epicuticulares (Sutter y Langhans, 1985); en algunas plantas, los estomas de las hojas producidas *in vitro* son anormales, es decir son incapaces de cerrar, cuando son expuestos a niveles extremos de inductores del cierre estomático como: La oscuridad, concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub>, ácido abscísico (ABA) y humedad relativa baja (Brainerd *et al.*, 1981; Preece y Sutter, 1991; Santamaría y Davies, 1994). Por lo tanto, el tejido de las plantas cultivadas *in vitro* pierde rápidamente agua cuando son transferidas a campo.

La segunda razón, las vitroplántulas se cultivan en medios con sacarosa (u otros carbohidratos) y con una intensidad de luz baja, que provocan bajas tasas de fotosíntesis, produciendo entonces un crecimiento totalmente mixotrófico. Al salir al campo tienen que cambiar su metabolismo a uno autotrófico en forma repentina.



Esquema 1. Etapas de la micropropagación (Murashige, 1974; Sutter y Langhans, 1979, 1980; Débergh et al., 1981).

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación ofrece algunas ventajas sobre las técnicas de propagación convencionales (Esquema 2).

I. Se puede producir un gran número de plantas a partir de un sólo individuo en un tiempo y espacio relativamente pequeño.

II. La micropropagación se lleva a cabo bajo condiciones de asepsia, por lo que una vez que los cultivos han sido establecidos no hay pérdidas de las plantas debido a enfermedades (Vasil y Vasil, 1980; George y Sherrington, 1984).

III. Como consecuencia de lo anterior, se facilita el transporte e intercambio de germoplasma, sin riesgo de introducir plagas y/o patógenos (Vasil, 1980).

IV. La uniformidad genética del material propagado, disminuyendo la variación genotípica propia de las poblaciones generadas por propagación sexual (semilla).

Las principales desventajas de los métodos *in vitro* son:

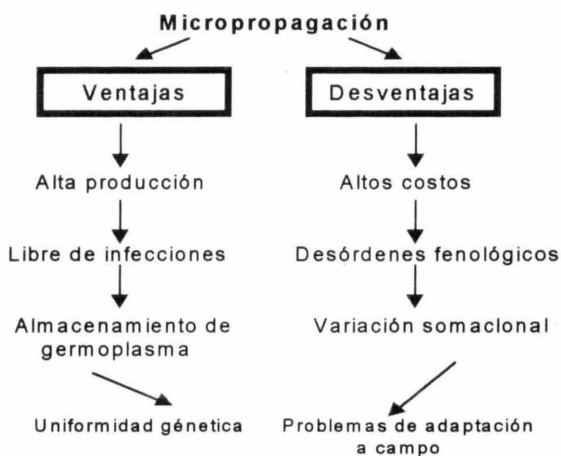
I. La producción de estas plantas resulta muy costosa en comparación con las técnicas tradicionales de propagación.

II. Algunas especies son particularmente sensibles a las condiciones de cultivo *in vitro*, desarrollando desórdenes fisiológicos. El más común es una alteración llamada vitrificación, se caracteriza por el desarrollo de hojas con apariencia vítreas. La razón de esta alteración se ha asociado con un bajo contenido

de lignina (Vieth *et al.*, 1983), falta de tejido de empalizada (Debergh *et al.*, 1981), entrada de agua y desbalance iónico debido a concentraciones elevadas de  $K^+$  y reducidas concentraciones de  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Na^+$  (Kevers y Gaspar, 1986).

III. Otro problema es la variación somaclonal (variación fenotípica ya sea de origen genético o epigenético).

IV. Las plantas producidas *in vitro*, requieren de un período de adaptación antes de que sean capaces de crecer en el campo o en forma independientemente (George y Sherrington, 1984) (Esquema 2).



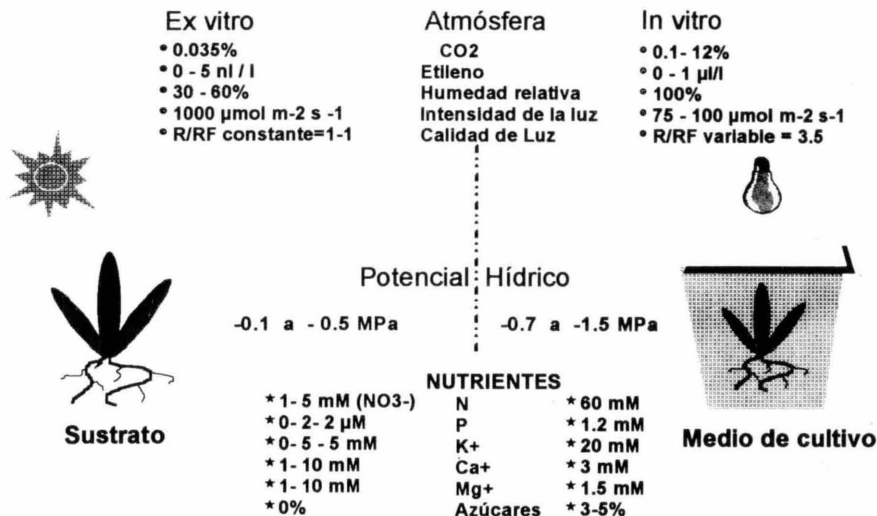
Esquema 2. Ventajas y desventajas de la utilización de las técnicas de micropropagación en plantas.

## COMPARACIÓN DE CONDICIONES AMBIENTALES EN PLANTAS CULTIVADAS *IN VITRO* Y CAMPO

El establecimiento en campo de las plantas micropropagadas es un proceso complejo de readaptación del material propagado a condiciones ambientales y fisiológicas diferentes a las encontradas *in vitro*.

Las condiciones de campo e *in vitro* más sobresalientes se basan principalmente en el tipo de atmósfera, nutrientes, fuente de carbono, sustrato, intensidad y calidad de la luz (Esquema 3).

## Parámetros medioambientales en condiciones *ex vitro* e *in vitro*



Esquema 3. Factores ambientales que imperan en el cultivo *in vitro* que afectan el crecimiento, desarrollo y morfogénesis de las plantas micropropagadas en comparación con las plantas cultivadas en condiciones naturales (Kozai et al., 1992; Santamaría y Davies, 1994).

Las llamadas "condiciones óptimas", en las cuales se desarrollan las plantas micropropagadas son diferentes a las condiciones del ambiente natural, por eso las plantas producidas *in vitro* necesitan un periodo de adaptación más largo antes de salir a campo.

Una de las grandes diferencias son los azúcares que adicionan a los medios de cultivos en plantas micropropagadas. Los azúcares exógenos son un factor que evita el desarrollo fotoautotrófo de estas plantas y en consecuencia reducen la capacidad fotosintética por una posible desactivación o inhibición de las enzimas encargadas de fijar el CO<sub>2</sub> (Hdider y Desjardins, 1995).

## LOS CARBOHIDRATOS EN EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

### a. Generalidades

En el cultivo *in vitro*, los carbohidratos son esenciales para el crecimiento y desarrollo organizado de los tejidos, ya que ellos son fuente de energía por un lado y suministro de esqueletos carbonados para los procesos de biosíntesis por el otro.

La magnitud del crecimiento parece estar determinada por el destino de estos carbohidratos exógenos después de entrar a las células (Gambor *et al.*, 1976). Sin embargo, es bien conocido que la capacidad de los tejidos para utilizar los diferentes carbohidratos varía tanto entre las especies como entre los tipos de explantes (ej. brotes, raíces, callos, células), por lo tanto su eficiencia depende de la absorción y capacidad para metabolizar las moléculas específicas, usadas como fuente de carbono.

En el cultivo de tejidos es probable que los diferentes azúcares presentes en los medios de cultivo, puedan ser directamente transportados por difusión a través del corte sobre la superficie del tallo (en caso de esquejes). En consecuencia, azúcares reductores como glucosa y fructosa que normalmente no son transportados por los tubos cribosos, puedan entrar. Además, se ha propuesto que las membranas de las células son permeables a estos solutos, ellos son generalmente acumulados y metabolizados (Welander *et al.*, 1989).

Por lo tanto, se ha propuesto que en cultivo de tejidos, la traslocación y asimilación del carbono del medio de cultivo también pueden verse afectados por la ontogenia de la hoja y en general de la planta, así como de las condiciones ambientales imperantes dentro del contenedor (Hall y Baker, 1972; Pate, 1976; Richardson y Baker, 1982).

La tasa de asimilación de cada carbohidrato varía de acuerdo con la concentración, el tipo de azúcar y el tiempo del cultivo. Los experimentos realizados por Welander (1989) demostraron que los compuestos de azúcares normalmente presentes en los exudados de los tubos cribosos en el floema de plantas de campo o silvestres, pueden ser usados como buen indicador del tipo de fuente de carbono a utilizar en cultivo *in vitro*.

El requerimiento de carbohidratos *in vitro* fue primeramente estudiado por Gautheret (1945), usando raíces normales de zanahoria, y el medio de Nobecourt modificado con sacarosa al 10%, vitamina B (tiamina), cisteína y AIA. Desde entonces, la sacarosa se utiliza como una fuente de carbono para proveer el crecimiento y la diferenciación de los sistemas *in vitro*, aunque también existen otros tipos de compuestos (como las pentosas y hexosas) que pueden ser utilizadas para el cultivo de tejidos.

Se han usado diversas fuentes de carbono en los protocolos de micropropagación, dependiendo de la especie y el tipo de explante. Estudios previos indican la importancia del metabolismo de los carbohidratos en los



procesos de iniciación que está asociada con la utilización de azúcares libres en el medio y la acumulación de almidón.

Diversos autores han reportado que las plantas cultivadas *in vitro* presentan ciertas alteraciones como un mal funcionamiento de los cloroplastos (Lee *et al.*, 1985; Capellades *et al.*, 1991; Lees *et al.*, 1991), limitada fotosíntesis (Nato y Mathieu, 1978; Kumar *et al.*, 1988; Hdider y Desjardins, 1995), enzimas encargadas de fijar CO<sub>2</sub> atmosférico (Langford y Wainwright, 1988) y estomas anormales (Brainerd *et al.*, 1981; Santamaría y Davies, 1994).

#### b. Tipos de carbohidrato

La sacarosa ha sido considerada como la principal fuente de carbono en cultivos de tejidos y sigue siendo hasta la fecha, la preferida entre todas las alternativas posibles. Algunos trabajos reportan que la sacarosa es una buena fuente de carbono seguida de glucosa, maltosa, rafinosa; siendo la fructosa menos efectiva y manosa, lactosa los carbohidratos menos utilizados. La sacarosa es invariablemente el mejor carbohidrato. Sin embargo, se ha encontrado que la glucosa puede proveer mejor crecimiento y organogénesis, en algunas especies que la sacarosa. Se ha reportado que en la multiplicación de brotes de *Alnus crispa*, *A. cordata* y *A. rubra*, la mejor fuente de carbono es glucosa, mientras que para *A. glutinosa* es la sacarosa (Tremblay y Lalonde, 1984; Barghch, 1989). En la formación de brotes directos en discos de hojas de *Capsicum annum* se ha reportado que se requiere la presencia de glucosa por 16 h durante un día (Phillips *et al.*, 1985). Se ha reportado un requerimiento de glucosa en cultivo de raíces aisladas de trigo (Furgunson, 1967) y en algunas otras monocotiledóneas (Bhojwan y Razdan, 1983).

Algunos otros monosacáridos como arabinosa y xilosa; disacáridos como celobiosa, maltosa y trehalosa; y algunos polisacáridos; (capaces de hidrolizarse en glucosa y fructosa), algunas veces pueden ser usados para reemplazar parcialmente a la sacarosa (Smith y Stone, 1973; Minocha y Halperin, 1974; Zaghmout y Torres, 1985) (*Cuadro 1.1*).

| Carbohidrato         | Capacidad reductora | Productos de Hidrólisis enzimática | Importancia nutricional |
|----------------------|---------------------|------------------------------------|-------------------------|
| <b>Monosacáridos</b> |                     |                                    |                         |
| <b>Hexosas</b>       |                     |                                    |                         |
| Glucosa              | Reductor            | Ninguno                            | ++++                    |
| Fructosa             | Reductor            | Ninguno                            | ++                      |
| Galactosa            | Reductor            | Ninguno                            | ++                      |
| Manosa               | Reductor            | Ninguno                            | ++                      |
| <b>Pentosas</b>      |                     |                                    |                         |
| Arabinosa            | Reductor            | Ninguno                            | ++                      |
| Ribosa               | Reductor            | Ninguno                            | ++                      |
| Xilosa               | Reductor            | Ninguno                            | ++                      |
| <b>Disacáridos</b>   |                     |                                    |                         |
| Sacarosa             | no reductor         | Glucosa, fructosa                  | +++++                   |

|                     |             |                              |     |
|---------------------|-------------|------------------------------|-----|
| Maltosa             | Reductor    | Glucosa                      | +++ |
| Celobiosa           | Reductor    | Glucosa                      | ++  |
| Trehalosa           | no reductor | Glucosa                      | ++  |
| Lactosa             | Reductor    | Glucosa, galactosa           | +   |
| <b>Trisacáridos</b> |             |                              |     |
| Rafinosa            | no reductor | Glucosa, galactosa, fructosa | +++ |

Cuadro 1.1. Principales carbohidratos que pueden ser utilizados por las plantas. El valor del azúcar por su importancia nutricional proveedora de carbono está indicado por número de +++++, lo que equivale a muy nutricional y así de manera decreciente (George, 1993).

En callos de *Phaseolus*, Jeff y Northcote (1967) determinaron que la sacarosa puede ser reemplazada por maltosa y trehalosa (los tres azúcares tienen un radical  $\alpha$ -glucosil y una terminación no reductora) pero no por glucosa o fructosa o una combinación de ambos y tampoco podría ser remplazada por otros carbohidratos.

La galactosa según lo que se ha reportado es tóxica para la gran mayoría de las especies de plantas, ya que en cultivo *in vitro* se inhibe el crecimiento como, por ejemplo, en orquídeas con las que una concentración tan baja como 0.01% (0.9 mM) es capaz de inhibir su crecimiento (Ernst *et al.*, 1971; Arditti y Ernst, 1984). Aunque no es capaz de contribuir a la nutrición en cultivo de tejidos vegetales, se ha encontrado que la galactosa puede reducir la hiperhidricidad en los cultivos de brotes (Druart, 1988).

También se ha reportado que la fructosa previene la hiperhidricidad (Rugini *et al.*, 1987) en algunos cultivos micropropagados. En algunas especies de orquídeas, se ha obtenido un buen crecimiento usando como fuente de carbono fructosa en vez de glucosa (Ernst, 1967; Ernst *et al.*, 1971; Arditti, 1979).

La fructosa resultó ser una buena fuente de carbono para la producción de brotes adventicios en nudos cotiledonarios de *Glicine max*, especialmente si la concentración de sales es suministrada adecuadamente (Wright *et al.*, 1986). El crecimiento de brotes de hojas y formación de brotes axilares en *Castanea* se ve estimulada cuando la sacarosa es reemplazada por 30 g/l de fructosa. Sin embargo, en callos basales a los que se les suministró fructosa (30 g/l), su crecimiento se redujo (Salesses, 1988).

Sin embargo, la fructosa ha sido reportada como tóxica para los tejidos de zanahoria, si es utilizada como fuente de carbono y esterilizada (con autoclave) conjuntamente con el medio de White. Pero si se esteriliza utilizando filtración, entonces puede promover el crecimiento de los callos, incrementando su peso final hasta un 70% más que la sacarosa (Pollard *et al.*, 1961).

Además, ciertas especies de plantas cambian su capacidad para utilizar los diferentes azúcares inusuales.

En su momento, Gautheret (1945) logró cultivar callos de zanahorias con maltosa, mientras que Mathes *et al.*, (1973) obtuvieron tan sólo un crecimiento

mínimo en tejidos de *Acer* en un medio suplementado con maltosa. Reportes similares se obtuvieron con el frijol, encontrándose que el crecimiento con maltosa fue bajo (Limberg *et al.*, 1979).

Muy pocas especies de plantas pueden metabolizar el disacárido, lactosa. Cuando se adiciona lactosa al medio de cultivo se induce la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, la cual es secretada dentro del medio de cultivo, hidrolizando la lactosa en galactosa y glucosa, permitiendo entonces el crecimiento de *Nemesia strumosa*, callos de *Petunia hybrida* y suspensiones celulares de pepino (Hess *et al.*, 1979; Callebaut y Motte, 1988). Rodríguez y Lorenzo Martín (1987) determinaron que en el medio MS, en el que reemplaza a la sacarosa por 30 g/l de lactosa el número de brotes producidos en cultivos de *Musa accuminata* aumenta.

Los azúcares-alcoholes, usualmente no son metabolizados por los tejidos de la planta y generalmente no son usados como fuente de carbono. Por esta razón el manitol y el sorbitol son empleados frecuentemente para modificar el potencial hídrico ( $\Psi$ ) de los medios de cultivo. Sin embargo, la presencia de estos azúcares puede provocar que las plantas micropropagadas no puedan disponer del boro presente en el medio de cultivo (George *et al.*, 1993)

El manitol es producido por algunas plantas como producto primario de la fotosíntesis y por ello estas plantas son capaces de metabolizarlo; ej. los tejidos de *Fraxinus* (Wolter y Skoog, 1966; Tholalakabavi *et al.*, 1994). Se ha reportado que el sorbitol como el producto primario de la fotosíntesis y el principal azúcar translocado en especies como *Malus* y *Prunus*, las cuales pertenecen a la familia Rosaceae (Wellart, 1980). La capacidad de esta familia, para usar al sorbitol adicionado al medio de cultivo como fuente de carbono se reportó por Albrecht (1986), quien determinó que en brotes de manzano silvestre micropropagados, su requerimiento de aumento, al comparar el crecimiento obtenido con la sacarosa exógena.

Por lo tanto, se puede concluir que el tipo de fuente de carbono tiene una marcada influencia sobre el porcentaje y el número de explantes, la formación de brotes, el número de nudos separables por brote, así como en su longitud (George *et al.*, 1993).

c. La sacarosa como fuente de carbono más comúnmente utilizada en el cultivo de tejidos vegetales.

Un gran número de investigaciones se han enfocado en la forma de entrada de la sacarosa, su metabolismo y su biosíntesis. Se ha sugerido que la sacarosa entra al tejido cuando es hidrolizada por la invertasa, y la glucosa y fructosa obtenidas, son tomadas por las células (Hisajima y Ito, 1983). Dentro de las células estos dos monosacáridos son empleados para la producción de energía (Sahulka y Lisa, 1980), la formación de esqueletos de carbono para los diferentes procesos de biosíntesis (Radin *et al.*, 1978) y la biosíntesis de sacarosa (Hisajima *et al.*, 1980).

Existen pocas evidencias que permitan entender el efecto negativo de la presencia de sacarosa exógena sobre la fotosíntesis de las plantas micropropagadas.

Se ha propuesto que a raíz de su presencia se desencadenan eventos tanto bioquímicos como fisiológicos. Uno de los eventos bioquímicos más estudiado es la reducción de la actividad fotosintética de las plantas micropropagadas (Maene y Debergh, 1987; Capellades *et al.*, 1991; Hdider y Desjardins, 1995), ocasionada por la acumulación de carbohidratos solubles y productos glucolíticos en las hojas (Grout *et al.*, 1987).

También se han reportado diferencias estructurales en las hojas, a nivel ultraestructural de cloroplastos, dependiendo posiblemente de la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo (Donnelly *et al.*, 1984).

Entender los cambios tanto fisiológicos como bioquímicos que ocurren durante el desarrollo y crecimiento de las plantas micropropagadas, es de suma importancia para desarrollar técnicas más eficientes para la aclimatación, principalmente en el establecimiento de cultivos autotróficos que sean capaces de usar el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono.

## INDUCCIÓN DE LA FOTOAUTÓTROFIA EN CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS MICROPROPAGADAS.

Como se ha reportado en la micropropagación convencional, una humedad relativa alta, temperatura constante, intensidad de luz baja y la presencia de azúcares en el medio de cultivo, parecen causar un efecto negativo sobre el vigor de las plantas y su protección contra la contaminación de bacterias y/o hongos. Estos factores causan que los explantes y las plántulas *in vitro* presenten bajas tasas de fotosíntesis, específicamente por la presencia de una fuente de carbono exógena para su crecimiento.

Por lo tanto, es importante la realización de estudios que permitan optimizar en la concentración de los nutrientes del medio de cultivo, así como determinar cuando y que medio puede ser aplicado a los explantes/plántulas *in vitro*.

La micropropagación fotoautotrófica o simplemente micropropagación autotrófica se define como el método de propagación de plantas basado en la fotoautotrofia del cultivo de tejidos, en que se utiliza a CO<sub>2</sub> como principal fuente de carbono.

En este tipo de cultivos, el crecimiento y desarrollo están fuertemente influenciados por varios factores físicos ambientales, como la luz, concentración de CO<sub>2</sub>, la humedad relativa, la velocidad del flujo del aire, la temperatura, la concentración de O<sub>2</sub>, etc.

El cultivo de células fotoautotróficas ha sido ampliamente utilizado para el estudio del desarrollo y biogénesis del cloroplasto (Horn y Dalton, 1984; Horn y Wihdholm, 1984). Sin embargo, existe poca información del efecto del ambiente sobre el crecimiento fotoautotrófico y el desarrollo *in vitro* de plantas.

La micropropagación fotoautotrófica parece tener muchas ventajas sobre la micropropagación convencional. Puede contribuir, a la reducción de los costos de producción y es considerada como una importante tecnología del futuro en la industria de la micropropagación.

Entre las ventajas más sobresalientes se puede incluir la promoción del crecimiento de las plántulas *in vitro* y *ex vitro* por medio del control del ambiente. Tasas elevadas de multiplicación, elevado porcentaje de sobrevivencia, una reducción en la contaminación, y además costos bajos de mano de obra por una simplificación en los métodos utilizados en la micropropagación y las etapas de aclimatación.

## MODELO DE ESTUDIO: *Tagetes erecta*

### I. Sistemática

*Tagetes erecta* pertenece a la familia de las compuestas, la cual está formada por 1,500 especies aproximadamente, agrupadas en 12 y hasta 20 tribus; de entre todas las tribus destaca *Tagetes* por su mayor distribución y número de especies.

Actualmente el género *Tagetes*, de acuerdo a Gómez Villar (1981) y Holmes (1983), tiene la siguiente clasificación taxonómica:

**Reino: Vegetal**  
**Subreino: Embriophyta**  
**División: Magnoliopsida**  
**Subdivisión: Magnoliophytina**  
**Clase: Magnoliopsida**  
**Subclase: Asteridae**  
**Orden: Asterales**  
**Familia: Asteraceae**  
**Tribu: Tagetae**  
**Subtribu: Tageteninae**  
**Género: Tagetes**  
**Especie: erecta**

### II. Descripción botánica

*Tagetes erecta* (cempasuchil) es una planta anual, de crecimiento rápido, tiene poca altura (25 a 70 cm), si bien ocasionalmente alcanza hasta un metro de altura, es arbustiva y aromática. Las hojas son opuestas, ramificadas generalmente pinnasectadas integradas por 11 a 17 pinnas lanceoladas o lineal-lanceoladas, aserradas, con los extremos agudos o acuminados; además, presentan glándulas de aceite diseminadas sobre su superficie.

Las flores están agrupadas en capítulos muy vistosos de color amarillo claro hasta naranja muy intenso. Los capítulos son radiados, con flores dimórficas; las

marginales uniseriadas, femeninas, liguladas y las del disco hermafroditas tubulares (Matuda, 1958).

*Tagetes erecta* es una planta alógama que se propaga principalmente por semilla; sin embargo, también se puede propagar vegetativamente por medio de esquejes (Singh, 1985).

### III. Importancia económica

#### a. Generalidades

En México *T. erecta* se considera económicamente importante por la amplia variedad de usos que tiene, entre los principales se encuentra su empleo como planta de ornato durante las celebraciones religiosas.

Además, esta planta es fuente potencial para la producción de plaguicidas. Se ha reportado (Gómez Villar, 1981) su uso para el control biológico de nemátodos, ya que de ella se han aislado y caracterizado compuestos activos con propiedades biocidas, entre los que se encuentran los tiofenos, con propiedades nematicidas de amplio espectro.

Neher (1966), ha indicado que el cempasuchil ha sido usado en la medicina popular contra cólicos, además se ha empleado como: antiséptico, carminativo, diurético, vermífugo, anestésico, etc. Por último se ha empleado como pigmentante para la piel y carne de pollos de engorda (Cuadro 1.2).

| Órgano y/o tejido | Usos                                         | Referencias                    |
|-------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|
| Flor              | Colorante para ropa y alimento               | Dastur, 1960                   |
| Flores y planta   | Planta de ornato en celebraciones religiosas | Kaplan, 1960                   |
| Hojas             | Afrodisiaco                                  | Hernández, 1972                |
| Hojas             | Medicinal                                    | Neher, 1966                    |
| Hojas             | Nematicida                                   | Gómez Villar, 1981             |
| Hojas             | Fungicida                                    | Morillo-Rejesus y Decena, 1982 |

Cuadro 1.2. Recopilación a través de la historia de los principales usos de *Tagetes erecta*.

#### b. Importancia económica en el ámbito industrial

La flor de cempasuchil es una fuente de xantofilas en forma de éster entre las que destacan hasta 17 carotenoides diferentes: luteína (88%), zeaxantina (3.6%), fitoeno (3.1%), fitofloeno (2.0%) y otros en trazas (3.0%). Los carotenoides y flavonoides son ampliamente utilizados en la industria alimentaria como ingredientes de alimento para aves ya que confieren un color amarillo a la carne, yema de huevo y piel de los pollos en engorda. En países como México, en donde la dieta de dichos animales es deficiente en elementos carotenoides, el empleo de la harina obtenida a partir de la flor deshidratada, ha convertido al cempasuchil en una importante fuente de materia prima, requiriéndose de 50 a 60 mg de xantofilas

por kilo de alimento (Gómez Villar, 1981). Sin embargo, existen diversos factores que afectan los rendimientos en la producción de pigmentos a partir de *T. erecta* como: la variabilidad en el contenido de pigmentos y morfología floral, su sensibilidad al ataque por patógenos (principalmente hongos) y al estrés hídrico.

## HIPÓTESIS

I. La presencia de sacarosa en el medio de cultivo, producirá una disminución en la capacidad fotoautotrófica, es decir en el contenido de pigmentos, tasas netas de fijación de CO<sub>2</sub>, acompañada de una disminución en la actividad de Rubisco y un aumento en la actividad de PEPc en vitroplantas de *T. erecta*.

II. La reducción en la concentración de sacarosa o su sustitución por glucosa o fructosa (monosácaridos) en el medio de cultivo, inducirá un aumento en la capacidad fotoautotrófica de vitroplantas de *T. erecta*.

## OBJETIVO GENERAL

Inducir un aumento en la capacidad fotoautotrófica en vitroplantas de *Tagetes erecta*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo (0,1.5 y 3%) sobre la capacidad fotoautotrófica de vitroplantas de *T. erecta*.

2. Evaluar el efecto de la sustitución de la fuente de carbono, convencionalmente usada en los medio de cultivo (sacarosa), por glucosa y fructosa sobre la capacidad fotoautotrófica de vitroplantas de *T. erecta*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Albrecht C** (1986). Optimization of tissue culture media. Comb. Proc. Int. Plant. Prop. Soc. **35**, 196-199.
- Arditti J** (1979). Aspects of the physiology of orchids. Adv. Bot. Res. **7**, 421-655.
- Arditti J, Ernest R** (1984) Physiology of germinating orchid seeds. In Arditti J (Eds) Orchid Biology- Reviews and Perspectives III, pp. 177-222. Comstock Publishing, Cornell Univ. Press, Ithacas, London.
- Barghch M** (1989) Micropropagation of *Alnus cordata* (Loisel), Losisel. Plant Cell Tiss. Organ Cult. **15**, 233-244.
- Beelen J** ( 1984). Introductory coarse on in vitro culture. Departament of tropical crop science. Agricultural university. Internacional Agriculture Center. Wageningen, The Netherlands.
- Bhojwan SS, Razdan MK** (1983). Plant Tissue Culture: Theory and practice. Developments in crop's science: Elsevier. 25-141.
- Brainerd KE, Fuchigami LH, Kwiatkowski S, Clark CS** (1981). Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments. HortSci. **16**, 173-175.
- Callebaut A, Motte JC** (1988) Growth of cucumber cell in media with lactose or milk whey as carbon sources. Plant Cell Rep. **7**, 162-165.
- Capellades M, Lemeur R, Debergh P** (1991). Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa cultured in vitro*. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. **25**, 21-26.
- Debergh P, Haerbaoui Y, Lemeur R, Maene L** (1981). Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypotheses of overcome vitrification whit special reference to water potential. Physiol. Plantarum **53**, 181-187.
- Donnelly D, Vidaver WE, Lee KY** (1984). The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. Plan Cell, Tiss. and Organ Cult. **4**, 43-50.
- Druart PH** (1988). Regulation of axillary branching micropropagation of woody fruit species. Acta Hort **227**, 369-380.
- Ernest R, Arditti J, Healey PL** (1971). Carbohydrate physiology of orchid seedling. II Hydrolysis and effects of oligosaccharides. Am. J. Bot. **58**, 827-835.
- Ernst R** (1967). Effects of carbohydrate selection on the growth rate of freshly germinated *Phalaenopsis* and *Dendrobium* seed. Am Orchid. Soc. Bull. **36**, 1068-1073.
- Furguson JD** (1967). The nutrition of excised wheat roots. Physiol. Plant **20**, 276-284.
- Gambor OL, Murashige T, Thorpe TA, Vasil IK** (1976). Plant tissue culture media. In vitro **12**, 473-478.
- Gautheret RJ** (1945). Une voie nouvelle en biologié végétale. La culture des tissus. Gallimard, Paris.



- George EF, Sherrington PD** (1984). Plant propagation by tissue culture. First Edition. Exegetucs Ltd (Eds) 709 pp.
- George EF** (1993). Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. Exergetics Ltd. England.
- George EF, Sherrington PD** (1984). Plant propagation by tissue culture. First Edition. Exegetucs Ltd (Eds) 709 pp.
- Gómez Villar HC** (1982). Estudio de la variabilidad en algunas colectas de Cempazúchilt (*Tagetes sp*) Tesis Lic. Univ. Autónoma de Chapingo 60 p.
- Grout BWW, Price F, Donkin ME** (1987). Photosynthetic activity of cauliflower meristem cultures *in vitro* and at transplanting time. *Acta Hort.* **212**, 323-327.
- Hall SM, Baker DA** (1972). The chemical composition of *Ricinus* phloem exudate. *Planta*. **106**, 131-140.
- Hdider C, Desjardins Y** (1995). Reduction ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase efficiency by the presence of sucrose during the tissue culture of strawberry plantlets. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant*. **31**, 165-170.
- Hess D, Leipold G, Illg RG** (1979). Investigations on the lactose induction of  $\beta$ -galactosides activity in callus tissue culture of *Nemesia strumosa* and *Petunia hybrida*. *Z. Pflanzenphysiol* **94**, 45-53.
- Hisajima S, Hasegawa T, Suzuki T** (1980). Partial purification and properties of sucrose-phosphate synthase from Morning-glory callus cels. *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **27** (3), 167-172.
- Hisajima S, Ito T** (1983). Activity and cellular distribution of disaccharidases in cultured cells of Japonese Morning-glory. *Agr. Biol. Chem.* **47** (1), 107-109.
- Holmes T** (1983). Outline of plant. Classification. Longman, London and New York.
- Horn ME, Dalton CC** (1984). Photosynthetic cell culture and their biotechnological applications. *Intl. Assoc Plant Tissue Culture, Newsletter* **43**, 2-7.
- Horn ME, Widholm JM** (1984) Aspects of photosynthetic cell culture. In: Collins GB, Petolia JG (Eds) Applications of genetic engineering to crop improvement, (pp113-161). Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publs, Dordrecht.
- Jeff RA, Northcote DH** (1967). The influence of IAA and sugar on the pattern of induced differentiation in plant tissue culture. *J. Cell Sci.* **2**, 77-88.
- Kevers V, Gaspar L** (1986). Vitrification of carnation *in vitro* changes in ethylene production, ACC level and capacity to convert ACC to ethylene. *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.* **4**, 215-223.
- Kozai T, Fujimara K, Hayashi M, Aitken-Christie J** (1992). The *in vitro* environment and its control in micropropagation. Kurata K, Kozai T (Eds) Transplant production systems, pp. 247-282. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Kumar PP, Bender L, Thorpe TA** (1988). Activities of ribulose bisphosphate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase and  $^{14}\text{C}$ -bicarbonate fixation during *in vitro* culture of *Pinus radiata* cotyledons. *Plant Physiol.* **87**, 675-679.

- Langford PJ, Wainright H** (1988). Effect of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. *Ann of Bot.* **60**, 633-640.
- Lee N, Wetzstein HY, Sommer HE** (1985). Effects of quantum flux density on protosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiol.* **78**, 637-641.
- Lees RP, Evans EH, Nicholas JR** (1991). Photosynthesis in *Clematis*, "The president", during growth *in vitro* and subsequent *in vitro* acclimatization. *J. Exp. Bot.* **238**, 605-610.
- Limberg M, Crees D, Lark KGI** (1979). Variants of soybean cells which can grown in suspension with maltose as a carbon-energy source. *Plant Physiol.* **63**, 718-721.
- Maene LJ, Debergh PC** (1987). Problems related to *in vitro* rooting of *in vitro* propagated shoots. In: Schäfer-Menhur A (Ed) *Advances in Agricultural Biotechnology in vitro Techniques. Propagation and Long Term Storage* pp. 59-72. Dodrecht: Martinus Nijhoff.
- Mathes MC, Morsell M, Marvin JM** (1973). Use of various carbon sources by isolated maple callus cultures. *Plant Cell Physiol.* **14**, 797-801.
- Matuda E** (1958). *Las compuestas del estado de México*. Ediciones del Gob. Edo. México. Toluca, México.
- Minocha SC, Halperin W** (1974). Hormones and metabolites which control tracheid differentiation with or without concomitant effect on grown in culture tuber tissue of *Helianthus tuberosus* L. *Planta* **116**, 319-331.
- Murashige T** (1974). Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25**, 135-166.
- Nato A, Mathieu Y** (1978). Changes in phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose-biphosphate carboxylase activities during the photoheterotrophic growth of *Nicotiana tabacum* (cv. xanthi) cell suspensions. *Plant Sci. Lett.* **13**, 49-56.
- Neher RT** (1966). Monograph of the genus of *Tagetes* (Compositae) Ph. D. Dissertation. Indiana University 306p.
- Pate JS** (1976). Nutrients and metabolites of fluids recovered from xylem and phloem: significance in relation to long distance transport in plants. In: Wardlaw JF, Passioura JB (Eds), *Transport and Transfer Processes in Plants*, pp 251-281. London and New York. Academic Press.
- Phillips GC, Hubstenderger JF** (1985). Organogenesis in pepper tissue culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **4**, 261-269.
- Preece JE, Sutter EG** (1991). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh P, Zimmerman RH (Eds). *Micropropagation: Technology and Application*, pp. 71-93. Dodrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Radin JW, Parker LL, Sell CR** (1978) Partitioning of sugar between growth and nitrate reduction in cotton roots. *Plant Physiol.* **62**, 550-553.

- Richardson T, Baker DA** (1982). The chemical composition of cucurbit vascular exudates. *J. Exp. Bot.* **33**, 1239-1247.
- Rodriguez G, Lorenzo Martin JR** (1987). *In vitro* propagation of canary island banana (*Musa acuminata* Colla AAA var. *Dwarf cavendish*) studies of factors affecting culture obtention, preservation and conformity of the plants. *Acta Hort.* **212**, 577-583.
- Rugini E, Tarini P, Rossodivita ME** (1987). Control of shoot vitrification of almond and olive grown *in vitro*. *Acta Hort.* **212**, 177-183.
- Sahulka J, Lisa L** (1980) Effects of some disaccharides, hexoses and pentoses on nitrate reductase, glutamine and glutamate dehydrogenase in excised pea roots. *Physiol Plant.* **50**, 32-36.
- Salesses G, Chauvin JE** (1988). Advances in chestnut micropropagation (*Castanea* sp). *Acta Hort.* **227**, 340-345.
- Santamaría JM, Davies WJ** (1994). Control of water loss by delphinium plant (pp 155). Kluwer Academic Publishers.
- Singh SP** (1985). *Tagetes* sp. Short season flowering plants. B.R. Publishing corporation. Delhi, India. 178-185.
- Sutter E, Langhans RW** (1980). Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot tip culture. *HortSci.* **15**, 429C (Abst. 428).
- Sutter E, Langhans RW** (1979). Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **104**, 493-496.
- Temblay FM, Lalonde M** (1984). Requirements for *in vitro* propagation of seven nitrogen-fixing *Alnus* species. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **3**, 189-199.
- Tholakalabavi A, Zwiazek JJ, Thorpe TA** (1994). Effect of mannitol and glucose-induced osmotic stress on growth, water relations, and solute composition of cell suspension culture of poplar (*Populus deltoides* var. *occidentalis*) in relation to anthocyanin accumulation. *In vitro Cell. Dev. Biol.* **30**, 164-170.
- Vasil IK, Vasil V.** (1980). Clonal propagation. *En Vasil* (Edit) Perspective in plant cell and tissue. Academic. Press. New York.
- Welander M, Welander NT, Brackman AS** (1989) Regulation of *in vitro* shoot multiplication in *Syringa*, *Alnus* and *Malus* by different carbon sources. *J. Hort Sci.* **64**, 361-366.
- Wellart RAM** (1980). Distribution of sorbitol in Rosaceae. *Phytochem.* **19**, 2603-2610.
- Wolter KE, Skoog F** (1966) Nutritional requirements of *Fraxinus* callus cultures. *Am. J. Bot.* **53**, 263-269.
- Wright MS, Koehler SM, Hinchey MA, Carnes MG** (1986). Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. *Plant Cell Rep.* **5**, 150-154.

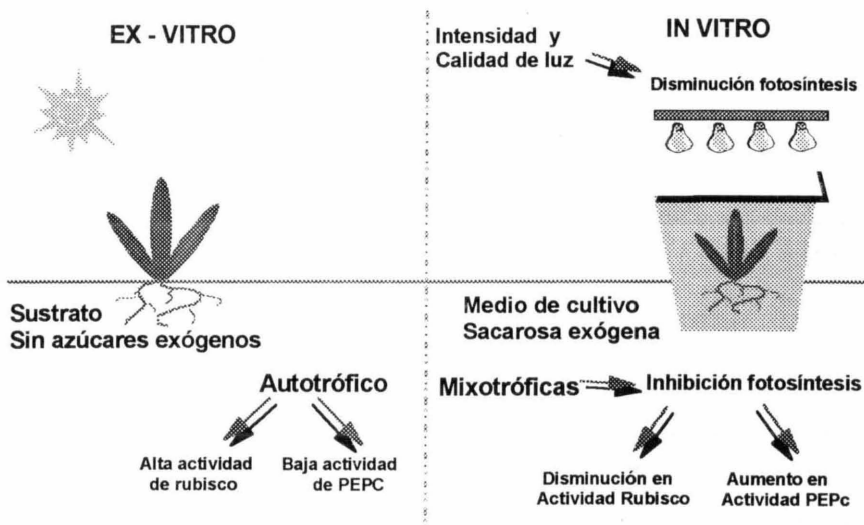
## CAPITULO 2

### Efecto de diferentes fuentes de carbono y concentración, sobre la capacidad fotoautotróficas en vitroplantas de *Tagetes erecta*

#### INTRODUCCIÓN

Las plantas, cuando son cultivadas en condiciones *in vitro*, son afectadas en sus procesos fisiológicos, bioquímicos y morfológicos debido a los factores ambientales imperantes en el microambiente como son: la composición del medio de cultivo (Murashige, 1974), la atmósfera del contenedor (Maene y Debergh, 1987) y la calidad y/o cantidad de luz (Lee, *et al.*, 1985) (*Esquema 2.1*).

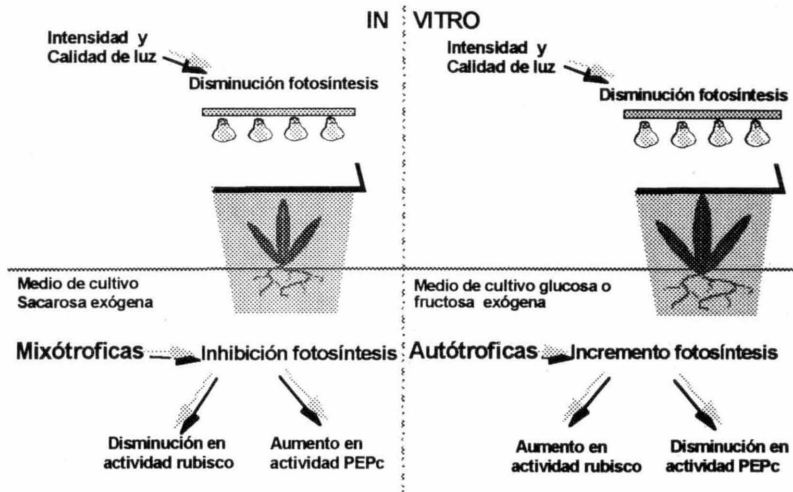
#### Efecto del ambiente *in vitro* en el metabolismo del carbono



*Esquema 2.1 Efecto del microambiente in vitro sobre el metabolismo del carbono de las plantas (Nato et al., 1978; Kumar et al., 1988; Hdider y Desjardins, 1995).*

Como han reportado varios autores (Donelly y Vidaver, 1984; Smith et al., 1986; Grout, 1988; Capellades et al., 1991; Lees et al., 1991; Hdider y Desjardins, 1995), estas plantas cultivadas *in vitro* presentan bajas tasas de fotosíntesis en comparación con las plantas cultivadas en invernaderos o en el campo (Donelly y Vidaver, 1984; Smith et al., 1986) (*Esquema 2.2*).

## Efecto del cambio azúcar exógeno en el metabolismo del carbono



Esquema 2.2 Efecto de la sustitución de sacarosa, normalmente utilizada en los protocolos de micropropagación por azúcares reductores como glucosa o fructosa sobre el metabolismo del carbono de las plantas (Lees *et al.*, 1991; Hdider y Desjardins, 1995).

En muchos casos, la actividad fotosintética de las vitroplantas se encuentra disminuida debido a que el balance del carbono es negativo (Grout y Price, 1987). Es decir, estas plantas requieren de un carbohidrato en el medio como fuente de carbono y energía para su crecimiento (Grout y Ashton, 1978). Varios autores han sugerido que la fuente de carbono en el medio de cultivo es el principal factor que inhibe la fotosíntesis (Hagimori *et al.*, 1984; Smith *et al.*, 1986; Langford y Wainwright, 1987; Lees *et al.*, 1991; Serret *et al.*, 1996).

La sacarosa es el carbohidrato comúnmente utilizado como fuente de carbono para el crecimiento de suspensiones celulares, raíces, tallos y otros tejidos en cultivo *in vitro* (Street 1971; Maretzk *et al.*, 1974; Street *et al.*, 1976; Wareing y Phillips, 1978; Dalton 1980). La principal razón de su preferencia se encuentra relacionada con una elevada eficiencia en el mecanismo de su entrada y translocación en las plantas cultivadas *in vitro* (Dalton, 1980).

Se ha reportado, que la sacarosa (disacárido) para entrar a los tejidos primero es hidrolizada mediante una enzima llamada invertasa, la cual se encuentra en el espacio entre la pared celular y el plasmodesma. La glucosa y fructosa (monosacáridos) producidos son posteriormente tomadas por la célula (Hisajima y Ito, 1983). Estos dos monosacáridos son metabolizados dentro de las células por la acción de diferentes enzimas citoplásmicas para la producción

de energía (Sahulka y Lisa, 1980) y la biosíntesis de otros componentes (Radín *et al.*, 1978; Hisajima *et al.*, 1980).

Se ha sugerido, que esta baja actividad fotosintética mostrada *in vitro* por las vitroplantas es específica y está relacionada a la presencia de sacarosa adicionada al medio de cultivo (Lees *et al.*, 1991).

Existen reportes que han mostrado que contenidos elevados de sacarosa en el medio de cultivo pueden reducir la capacidad fotosintética de las vitroplantas (Solárová, 1989; Capellades *et al.*, 1991; Mezzetti *et al.*, 1991; Nakayama *et al.*, 1991; Hdider y Desjardins, 1994,1995) (Esquema 2.1), (Lees *et al.*, 1991) (Cuadro 2.1).

| Cultivo                       | Condición                                                                                   | Resultados                                                                                                                                                                                                                                                           | Referencia                      |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Nicotiana tabacum</i>      | Efecto de sacarosa (0 y 2%) sobre la fotosíntesis                                           | La eliminación de sacarosa, como fuente de carbono, aumentó la PN, en comparación con su presencia al 2%                                                                                                                                                             | Solárová *, 1989                |
| <i>Rosa multiflora</i> L. cv. | Efecto de sacarosa (1,3 y 5%) en las tasas fotosintéticas                                   | La disminución en la concentración de sacarosa, aumentó la PN y disminuyó, la reserva de almidón en los cloroplastos.                                                                                                                                                | Capellades <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>Actinidia deliciosa</i>    | Efecto de sacarosa (0 y 2.5%) sobre el crecimiento y la distribución de diferentes azúcares | La disminución en la concentración de sacarosa aumentó la PN. El contenido máximo de monosacáridos (glucosa y fructosa), fue al día 30 de cultivo. La hidrólisis de sacarosa en el medio llegó hasta 80%.                                                            | Mezzetti <i>et al.</i> , 1991   |
| <i>Solanum tuberosum</i>      | Efecto de sacarosa (0 y 3%) sobre la PN                                                     | La disminución en la concentración de sacarosa aumentó la fotosíntesis                                                                                                                                                                                               | Nakayama <i>et al.</i> , 1991   |
| <i>Fragaria x ananassa</i>    | Efecto de sacarosa (0,1, 3 y 5%) sobre la fotosíntesis y la actividad de PEPc               | La disminución en la concentración de sacarosa aumentó la PN. En el tratamiento con elevada concentración de sacarosa se encontraron altas tasas de respiración, además la actividad de PEPc aumentó.                                                                | *Hdider y Desjardins, 1994      |
| <i>Fragaria x ananassa</i>    | Efecto de sacarosa (0 y 3%) sobre la PN y la actividad de Rubisco                           | Una disminución en la concentración de sacarosa produce un aumento la PN. En altas concentraciones de sacarosa se observó una disminución en la eficiencia de Rubisco debido a una desactivación y posiblemente unión de inhibidores en los sitios de carboxilación. | *Hdider y Desjardins, 1995      |

\* Experimentos realizados a diferentes intensidades de luz PAR (PPFD de 0 a 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

**Cuadro 2.1. Efecto de la sacarosa en el medio de cultivo sobre la capacidad fotosintética en diferentes especies de plantas cultivadas *in vitro*. PN= fotosíntesis neta, PEPc= fosfoenolpiruvato carboxilasa.**

En la mayoría de las especies se observa un efecto favorable sobre la morfología de las hojas y en la tasa de fotosíntesis (como fijación de  $\text{CO}_2$ ) al disminuir la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo (*Cuadro 2.1*).

No obstante, a pesar que las evidencias indican que la sacarosa inhibe la fotosíntesis de las plantas micropropagadas, aún no se conocen los eventos bioquímicos, moleculares y fisiológicos que permitan entender este fenómeno. Si bien se han propuesto varias hipótesis, para intentar explicar este fenómeno, hasta ahora no hay evidencias que sean determinantes en su explicación. Algunos hechos son:

a) Azcon-Bieto (1983) determinaron que cuando hay acumulación de carbohidratos en las hojas, la tasa de exportación de los azúcares se reduce y en consecuencia se produce una inhibición en la fotosíntesis.

b) La inhibición de la fotosíntesis puede deberse a una reducción en la tasa de regeneración del sustrato carboxilado RuBP, debido probablemente a la acumulación de azúcares solubles en las hojas (Azcon-Bieto, 1986), provocando una desactivación de la Rubisco por un aumento en los productos fosforilados (como el PGA), que por un lado limitan la posibilidad de que el fósforo inorgánico ( $\text{Pi}$ ) entre al cloroplasto desde el citoplasma, lo que conduce a una reducción en la actividad de la Rubisco activasa (Portris, 1992) y en consecuencia de la Rubisco. Por otro lado, se ha propuesto también que dichos compuestos fosforilados provocan una acidificación del estroma produciendo probablemente una liberación de  $\text{H}^+$ , en consecuencia hay un cambio de pH desactivando la Rubisco (Miziorko y Lorimer, 1983; Desjardins *et al.*, 1995).

c) Otra explicación de esta reducción en la fotosíntesis, es la posible inhibición en la síntesis de las subunidades de Rubisco (Neumann *et al.*, 1989).

Estudios recientes han revelado que las plántulas cultivadas *in vitro* pueden lograr un crecimiento fotoautotrófico, a través de la eliminación o reducción de sacarosa exógena, un incremento en la intensidad de luz de los cuartos de cultivo y un aumento en la concentración de  $\text{CO}_2$ , lo que propicia las condiciones ambientales favorables para una eficiencia óptima de la fotosíntesis (Kozai, 1991; Kozai *et al.*, 1990).

Otra fuente de carbono que ha sido estudiada, es la glucosa (monosacárido) que es un carbohidrato muy utilizado y parece ser una fuente de carbono apropiada para el cultivo de tejidos en diferentes especies (Hew *et al.*, 1988; Wainwright y Scrace, 1989; Welander *et al.*, 1989). Se ha determinado



que la glucosa es el principal promotor de la organogénesis en ciertas especies cultivadas *in vitro* (George, 1993).

La fructosa (monosacárido), es menos efectiva para la mayoría de las especies; sin embargo, se ha reportado que en el caso de las orquídeas, la fructosa es la fuente de carbono más efectiva para promover el crecimiento, además de reducir o prevenir problemas de hiperhidricidad, en comparación con la utilización de sacarosa y glucosa (Ernest, 1967; Ernest *et al.*, 1971; Arditti, 1979; Rugini *et al.*, 1987). Se ha reportado también que la fructosa es una buena fuente de carbono para la producción de brotes adventicios de *Glicine max* (Wright *et al.*, 1986). En tanto que en otras especies, como zanahoria la fructosa ha sido reportada como tóxica, si se utiliza como única fuente de carbono (Pollard *et al.*, 1961).

Por lo tanto, existe la posibilidad de obtener crecimiento de las vitroplantas *in vitro* en la fase III sobre un medio de cultivo con una concentración de sacarosa reducida, nula o sustituida por otra fuente de carbono, esto con el fin de obtener plantas fotoautotróficas que sean capaces de usar el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono, que tengan la posibilidad de presentar un crecimiento independiente de la sacarosa exógena y sean transferidas al campo exitosamente (Grout *et al.*, 1981).

En base a los antecedentes anteriores el objetivo de la presente tesis en primer lugar es analizar el efecto de sacarosa (1.5 y 3%) y sustituir esta fuente de carbono por glucosa o fructosa (3%) con el fin de inducir un crecimiento autotrófico de las plántulas *in vitro*, lo cual estará asociado con una mayor actividad de la Rubisco, enzima encargada de la fijación de CO<sub>2</sub>. De esta forma se producirán plántulas con un comportamiento similar al encontrado en las plantas cultivadas en campo.

Si lo anterior se puede probar, sería una alternativa viable desde el punto de vista de la biotecnología de los cultivos micropropagados a condiciones ambientales naturales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

#### Plantas cultivadas en campo

Las semillas de *Tagetes erecta* que se utilizaron se germinaron en charolas de plásticos, empleando como soporte papel filtro Whatman # 1 previamente humedecido con agua destilada. Las condiciones fueron de oscuridad, a una temperatura de 25 ± 4°C y humedad relativa de 60-80.



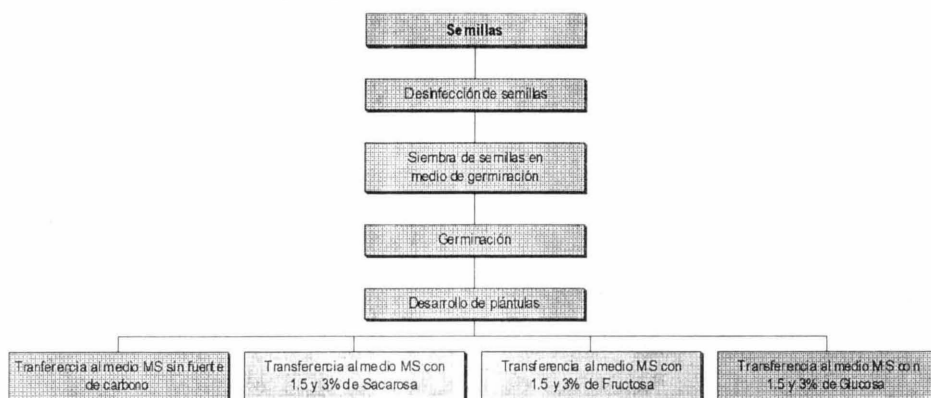
A los cinco días de germinadas, las plántulas resultantes se transfirieron a charolas empleando tierra como sustrato y se mantuvieron bajo condiciones de vivero cubriéndolas con malla contra insectos. Después de dos semanas se trasplantaron a una cama de tierra dejándolas totalmente a la intemperie. Las plantas fueron irrigadas cada tercer día con agua y fertilizadas con sulfato de amonio  $[(\text{NH}_4)\text{SO}_4]$  y Triple 17 (3 g/15 días). Las pruebas se realizaron cuando las plantas tuvieron 2 meses de edad.

### Plantas cultivadas *in vitro*

Se utilizó una parte del mismo lote de semillas de *Tagetes erecta* que ya se mencionó. Las semillas fueron lavadas con detergente biológico y desinfectadas durante un período de 30 minutos; después se enjuagaron 2 a 3 veces con agua destilada estéril.

Posteriormente, las semillas se sumergieron en etanol al 70% por 5 minutos dentro de una campana de flujo laminar. Al terminar el período, se sumergieron nuevamente en una solución de hipoclorito de sodio al 30% durante 8 minutos, posteriormente se enjuagaron 5 a 6 veces con agua destilada y estéril.

Las semillas desinfectadas se sembraron en el medio MS semisólido, (contiene sólo agua y agar al 1.1%) para inducir germinación. Por último, las plántulas germinadas fueron transferidas al medio MS que contenía sales, vitaminas, sin fuente de carbono y con sacarosa 1.5 y 3%, glucosa 3%, fructosa 3%. Los contenedores que se utilizaron fueron magentas sin ventilación. Las condiciones en donde se cultivaron fueron: temperatura de  $25 \pm 4^\circ \text{C}$ , intensidad de luz de  $60\text{-}100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , humedad relativa de 80-100% (Esquema 2.3).



Esquema 2.3 Protocolo que se utilizó para la germinación de semillas de *Tagetes erecta* introducidas a condiciones *in vitro*.

## Plantas cultivadas en cámaras de crecimiento

Se utilizaron semillas del lote antes mencionados de *Tagetes erecta*, que se germinaron en charolas de plástico empleando como soporte papel filtro, Whatman # 1 previamente humedecido con agua destilada. Las condiciones de germinación fueron en oscuridad, temperatura de  $25 \pm 4^\circ\text{C}$  y humedad relativa de 60-80%. Una vez germinadas, las plantas fueron transferidas a contenedores de crecimiento individuales teniendo como sustrato inerte, agrolita. Posteriormente, fueron cultivadas en una cámara de crecimiento en un ambiente controlado a una temperatura día/noche de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , una intensidad de luz de  $240 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y un fotoperíodo de 14 h. Las plantas fueron irrigadas diariamente con agua y cada tercer día con una solución nutritiva de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950). Cuando las plantas tuvieron 5 o 6 semanas de edad, fueron utilizadas para la prueba de dosis-respuesta a diferentes niveles de luz, evaluando las tasas de fotosíntesis.

## MÉTODOS

Se analizaron las actividades de las enzimas carboxilantes ribulosa-1,5 bifosfato carboxilasa (Rubisco) (EC 4.1.1.39) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPc) (EC 4.1.1. 31) de acuerdo al método reportado por Seeman *et al.*, (1985), modificado por Flores *et al.*, (1993) (*Esquema 2.4*).

### Rubisco

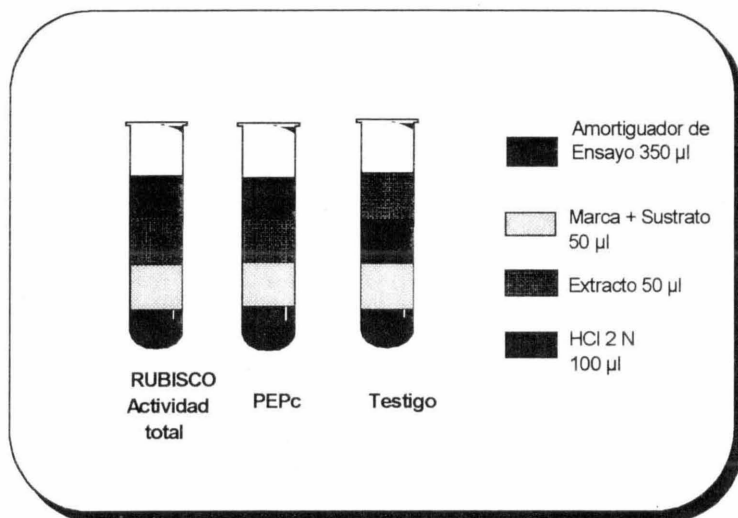
Se homogenizaron 0.20 g de tejido fresco (hojas) colectado durante el ciclo de 24 h, con 2.0 ml de amortiguador de extracción (50 mM bicina, 1 mM de EDTA, 20 mM DDT, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1% (w/v) PVP insoluble, 250  $\mu\text{M}$  PMSF, 50  $\mu\text{M}$  leupeptina, pH 8 a una temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . Se centrifugó a 15,000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se utilizó para realizar el ensayo enzimático y la determinación del contenido de proteínas totales. La actividad enzimática se determinó empleando un amortiguador que contenía 100 mM bicina, 1 mM EDTA, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT y 20 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8.5. Se adicionaron 200  $\mu\text{l}$  del extracto que contenía las muestras experimentales a 250  $\mu\text{l}$  del amortiguador de ensayo. Luego, se dejó incubando 30 minutos a una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

El siguiente paso fue agregar 10 mM de ribulosa 1,5 bifosfato y 2.5  $\mu\text{Ci}$   $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  para el iniciar la reacción. La reacción se llevó a cabo por 1 minuto a temperatura controlada a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , adicionándose 100  $\mu\text{l}$  de HCl 2.5 N para detener la reacción. Se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de está mezcla y se colocaron en un vial de centelleo, después la muestra se secó en su totalidad a una temperatura de  $30^\circ\text{C}$  (durante 24 h). En el último paso se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de agua destilada y 3

ml de solución de centelleo para proceder a su medición en el contador de centellador.

### PEPc

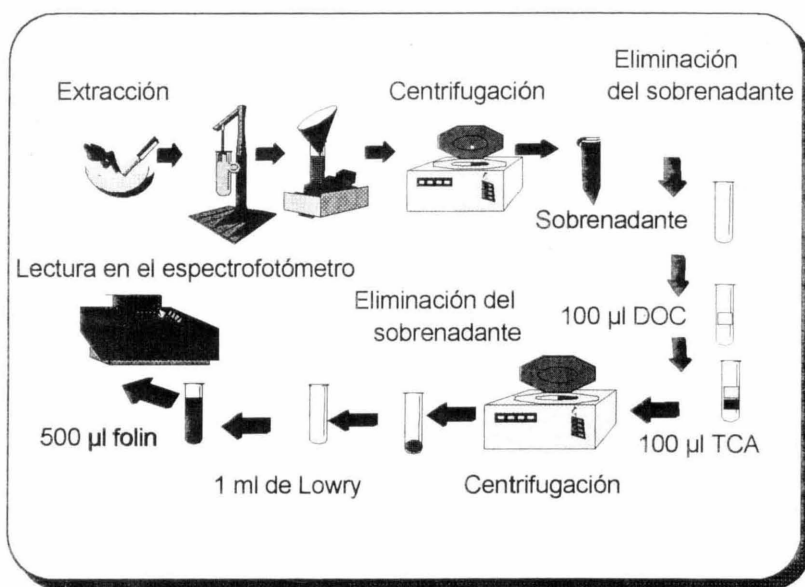
El procedimiento para determinar la actividad de PEPc fue muy similar al ensayo de la Rubisco, excepto que se empleo un amortiguador de ensayo diferente (100 mM bicina, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, 10 mM  $MgCl_2$ , 20 mM  $NaHCO_3$ , 5 mM glutamina). A 250  $\mu$ l de amortiguador de ensayo se le agregaron 150  $\mu$ l del extracto que contenía las muestras experimentales. La reacción se inició cuando se le adicionaron 10 mM de fosfoenolpiruvato y 2.5  $\mu$ Ci de  $NaH^{14}CO_3$ . Posteriormente, la mezcla se incubó durante 30 segundos, a temperatura de  $25 \pm 1^\circ C$  y la reacción se detuvo con 100  $\mu$ l de HCl 2.5 N. El procedimiento siguiente fue similar al que se utilizó en la determinación de la actividad de la Rubisco.



Esquema 2.4 Metodología para determinar la actividad de las enzimas carboxilantes; Rubisco y PEPc de acuerdo al método de Seeman, et al, (1985), modificado por Flores et al. (1993).

Determinación de proteínas por el método de Lowry *et al.*, (1951), modificado por Peterson, (1977) (*Esquema 2.5*).

Esta técnica consiste en adicionar a los tubos de ensayo diferentes cantidades de extractos. Posteriormente se aforaron todos los tubos a un volumen final de 1 ml con agua destilada. Se agregaron 100  $\mu$ l de la solución de desoxiocolato de sodio (DOC) a todas las muestras y se dejaron reposar 10 minutos. Luego, se adicionó el ácido tricloacetato (TCA), mezclándose bien y dejando reposar durante 15 minutos. Se centrifugó a 3,500 rpm durante 15 minutos, se decantó y se dejó secar la pastilla. Posteriormente, se disolvió con 1 ml del reactivo de Lowry, se le adicionó 1 ml de agua, se mezcló bien y se dejó reposar 20 minutos. Por último se le adicionaron 500  $\mu$ l del reactivo folin, la mezcla se dejó reposar durante 30 minutos y se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 750 nm.



*Esquema 2.5. Metodología para determinar el contenido de proteínas de acuerdo al método de Lowry *et al.*, (1951), modificado por Peterson, (1977).*

Determinación del contenido de la clorofila de acuerdo al método de Arnon (1949), modificado por Wellburn, (1994). (Esquema 2.6)

Se pesaron 0.20 g de tejido fresco (hojas), tanto plantas cultivadas en campo y micropropagadas con sacarosa (1.3 y 3%), glucosa y fructosa 3%, colectadas durante un ciclo de 24 h. Se homogenizaron con 2.0 ml de acetona al 80% a 4 °C. Posteriormente, el homogenado se filtró con gasa y al filtrado obtenido se le centrifugó a 3,000 rpm a 4 °C, durante 30 minutos. El siguiente paso, fue eliminar la pastilla y el sobrenadante recuperado, se utilizó para la determinación. En el último paso, se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 663 y 646 nm de longitud de onda.

Las fórmulas para calcular las cantidades de clorofila (Ca y Cb, respectivamente), son las siguientes:

$$Ca = 12.21 A_{663} - 2.81 A_{646}$$

$$Cb = 20.13 A_{646} - 5.03 A_{663}$$

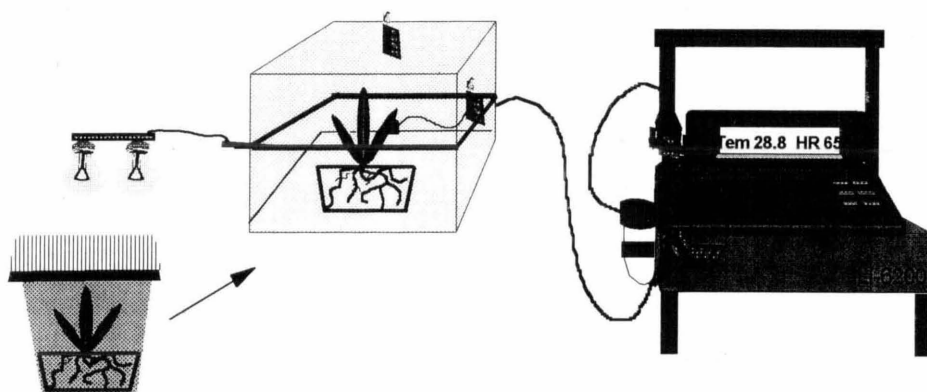


Esquema 2.6. Metodología para la determinación de las clorofilas a y b de acuerdo al método de Arnon (1949), modificado por Wellburn, (1994).

Evaluación de la tasa fotosintética (intercambio neto de  $\text{CO}_2$ ) por medio de un analizador de gases por infrarrojo (IRGA), Sistema de Fotosíntesis Portátil LI-6200 (LI-COR).

Las tasas de fotosíntesis (intercambio neto de  $\text{CO}_2$ ) de las plantas cultivadas en la cámara de crecimiento se determinaron a diferentes intensidades de luz, desde, 0 hasta  $2,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , en este caso se emplearon mallas sombras que dejan pasar entre 25 y un 50% de la luz solar. Para la evaluación de estas plantas se utilizó la cámara de  $405 \text{ cm}^3$  del IRGA, en donde se colocaron las hojas más expandidas.

En las plantas micropropagadas fue necesario aislar dichas plantas, empleándose contenedores individuales y así introducir la planta completa en la cámara de  $4100 \text{ cm}^3$  del IRGA (*Esquema 2.7*). Así, estas plantas se sembraron en cajas flotantes dentro de magentas que contenían medio MS, suplementado con sacarosa, glucosa y fructosa 3%. Al día 15 de cultivo se procedió a sacarlas de las magentas y sellar la parte superior de la caja flotante con parafilm, para evitar el intercambio gaseoso entre el medio del cultivo y el ambiente aéreo de la cámara de medición, debido a que afecta la determinación de la fotosíntesis (fijación de  $\text{CO}_2$ ).



*Esquema 2.7. Sistema que se utilizó para la medición de la fotosíntesis por medio del analizador de gases infrarrojo (IRGA). Este equipo es un Sistema de Fotosíntesis Portátil LI-6200 (LI-COR). En donde las plantas fueron sembradas en contenedores individuales, es decir cajas flotantes dentro de las magentas. Las cuales posteriormente se sacaron y se sellaron con parafilm, introduciéndola a la cámara para empezar las pruebas.*

Es importante destacar que para ello se mantuvo la temperatura, la humedad relativa y concentración inicial de  $\text{CO}_2$  en un rango de valores constantes dentro de la cámara al momento de las mediciones, para evitar alteraciones en la lectura del IRGA. Por esto se realizaron las mediciones en el nebulizador ya que en los

laboratorios la concentración de CO<sub>2</sub> era elevada y posiblemente alteraba las lecturas.

#### Evaluación del crecimiento en plántulas de *T. erecta* cultivada *in vitro*

El crecimiento de plántulas generadas de semillas germinadas *in vitro* se evaluó utilizando para cada punto un promedio mínimo de 3 plantas. En el caso del peso fresco, sólo se colectaron las plantas, poniéndolas en papel aluminio, para pesarlas en la balanza.

Posteriormente, estos mismos ejemplares fueron congelados con nitrógeno líquido y colocados en una liofilizadora hasta el secado total de las muestras. En el tiempo durante el cual se le extrajo la máxima cantidad de agua del tejido colectado, para calcular su peso seco.

#### Electroforesis

La electroforesis se realizó en geles de acrilamida al 10% con SDS (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles de electroforesis se prepararon de la siguiente manera:

| <b>Gel separador al 7.5%</b>  |         |
|-------------------------------|---------|
| Acrilamida-Bis 30-0.8%        | 7.5 ml  |
| Tris-HCl 1.5 M pH 8.8         | 7.5 ml  |
| SDS 10%                       | 0.3 ml  |
| Persulfato de amonio (PSA) 1% | 1.5 ml  |
| TEMED                         | 30 µl   |
| Agua destilada                | 13.2 ml |

| <b>Gel concentrador al 4%</b> |         |
|-------------------------------|---------|
| Acrilamida-Bis 30-0.8%        | 1.3 ml  |
| Tris-HCl 1.5 M pH 8.8         | 2.5 ml  |
| SDS 10%                       | 100 µl  |
| TEMED                         | 10 µl   |
| Persulfato de amonio (PSA) 1% | 0.5 ml  |
| Agua destilada                | 5.64 ml |

Cuadro 2.2 Lista de reactivos utilizados para la preparación de los geles de electroforesis, de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli, 1970).

Los extractos de las plantas que fueron cultivadas en campo y micropropagadas con sacarosa, o glucosa o fructosa al 1.5 y 3%, se disolvieron en la solución amortiguadora de Laemmli (agua, Trizma base, SDS,  $\beta$ -mercaptoetanol, glicerol y BFB), se calentaron entre 80 y 90 °C por 5 minutos y se corrieron a 50-60 mA por gel.

Se usaron como marcadores de pesos moleculares: la miosina (208 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (115 kDa), albúmina sérica bovina (79.5 kDa), ovalbumina (49.5 kDa), anhidrasa carbónica (34.8 kDa) y aprotinina (7.2 kDa).

### Tinción con plata

Esta técnica se basa en la reacción que se produce entre los grupos de aminas libres y los grupos sulfhidrilo de las proteínas con el nitrato de plata. La mayoría de las proteínas producen un color café monocromático o colores oscuros. Sin embargo, el teñido con plata puede producir otros colores. Las lipoproteínas tienden a teñirse de azul y algunas glucoproteínas parecen amarillas, cafés o rojas. El gel se lavó tres veces con metanol al 50%, posteriormente se dejó toda la noche en metanol al 50%. Al otro día se rehidrató el gel con agua desionizada durante una hora. Se agregó la solución de plata y se incubó una hora en agitación constante y en la oscuridad. Después se lavó 3 veces con agua destilada, cada 5 minutos. Luego, se agregó la solución de revelado y se dejó en contacto con el gel hasta la aparición de las bandas, la reacción se detuvo a criterio propio con 100 ml de una solución que contiene 10 ml de ácido acético, 45 ml de metanol y 45 ml de agua desionizada.

| <b><i>Solución de plata</i></b>                      | <b><i>Solución de revelado</i></b> |
|------------------------------------------------------|------------------------------------|
| 1.89 ml de NaOH 1 M                                  | 100 ml de formaldehído al 37%      |
| 21 ml de agua destilada                              | 47.6 ml de ácido cítrico 1 M       |
| 1.5 ml de $\text{NH}_4\text{OH}$                     |                                    |
| 0.6 g de $\text{AgNO}_3$ en 4 ml de agua desionizada |                                    |

*Cuadro 2.3 Composición de las soluciones que se utilizaron para la tinción con plata.*

El último paso fue agregar metanol al 50% como solución fijadora y en esta solución se almacenó el gel.



## RESULTADOS

### Germinación de semillas *in vitro*

Las plántulas fueron transferidas a medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con vitaminas, conteniendo las diferentes concentraciones de sacarosa y otros tipos de carbohidratos (glucosa, fructosa al 3%) así como sin ninguna fuente de carbono. Las plantas se dejaron desarrollar por un período de 2 a 3 semanas. Al final se evaluó la sobrevivencia (*Cuadro 2.1*).

| Germinación de semillas                   |                    |                    | Sobrevivencia de plantas |                   |
|-------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|
| Tratamientos con diferentes carbohidratos | Primera semana (%) | Segunda semana (%) | Tercera semana (%)       | Cuarta semana (%) |
| Sin azúcar                                | 100                | 25                 | 16                       | 0                 |
| Sacarosa 1.5%                             | 100                | 66.6               | 33                       | 33                |
| Sacarosa 3%                               | 100                | 83                 | 83                       | 83                |
| Glucosa 1.5%                              | 100                | 50                 | 33                       | 0                 |
| Glucosa 3%                                | 100                | 83                 | 69                       | 69                |
| Fructosa 1.5%                             | 100                | 50                 | 0                        | 0                 |
| Fructosa 3%                               | 100                | 66.6               | 66.6                     | 66.6              |

*Cuadro 2.1. Resultados del porcentaje germinación de las semillas y su sobrevivencia, con diferentes fuentes de carbono: glucosa, fructosa y sacarosa, así como diferentes concentraciones (1.5 y 3%) en plantas cultivadas in vitro de T. erecta.*

Las plantas que fueron cultivadas sin ninguna fuente de carbono, en muchos casos no sobrevivieron o presentaron muy bajas tasas de crecimiento, las cuales se asociaron con alteraciones morfológicas: vitrificación de los tejidos, clórosis, etc.

Sin embargo, las plántulas que fueron cultivadas con concentraciones elevadas de fuente de carbono: sacarosa, glucosa y fructosa al 3%, mostraron una sobrevivencia alta. Siendo mayor su desarrollo y sobrevivencia cuando existe la presencia de sacarosa al 3%, a diferencia de las plantas cultivadas con las demás fuentes de carbono, a la misma concentración.

Como se puede observar, el suplemento de una fuente de carbono a concentraciones elevadas favorece el crecimiento y el desarrollo de esas plantas cultivadas *in vitro*.

## Evaluación del crecimiento

Se evaluó el crecimiento de las plántulas cultivadas *in vitro* con las diversas fuentes de carbono (sacarosa, glucosa y fructosa al 1.5 y 3%), durante un período de 18 días (Fotos. 1, 2, 3, 4, 5).

Se observó, que entre los días 15 y 18 se inició la fase de crecimiento exponencial, teniendo así un incremento de las plantas cultivadas con sacarosa a diferentes concentraciones (1.5 y 3%) de 1.297 y 0.512 g con respecto al peso fresco inicial. Su comportamiento difirió a partir del día 7, debido a que en las plantas cultivadas con sacarosa al 1.5% se presentó una fase de crecimiento en forma lineal, no así en las plantas cultivadas con sacarosa al 3% donde a partir del día 6-7 se mostró una fase de crecimiento acelerada (fig. 2.1).

En las plantas cultivadas con glucosa y fructosa al 3%, se puede observar que entre los días 15 y 18 también se inicia la fase de crecimiento exponencial, teniendo así un incremento en peso fresco desde 0.78 g en fructosa 3%, hasta 1.8 g con glucosa 3%.

En relación al peso seco se encontró que las plantas cultivadas con sacarosa 3%, presentaron mayor incremento en biomasa al día 18 del cultivo, con un valor promedio de 0.0978 g que las plantas cultivada con sacarosa 1.5% donde obtuvieron un valor de 0.04 g en incremento.

El peso seco (fig. 2.2 B) encontrado en las plantas cultivadas con otras fuentes de carbono, glucosa al 3% presentaron un mayor incremento en biomasa al día 18 de cultivo, de 0.11 g mientras que las plantas cultivadas con fructosa al 3% presentaron un valor de 0.06 g.

Un comportamiento similar se encontró en plantas cultivadas con sacarosa y glucosa al 3%.

En general, las plantas que fueron cultivadas con glucosa al 3% presentaron mayor incremento en biomasa (en peso fresco y seco), en comparación con plantas cultivadas con sacarosa y fructosa al 3%. Las plantas que fueron cultivadas con fructosa presentaron bajas tasas tanto en peso fresco como en peso seco, en comparación con los demás tratamientos.

En las fotos y figuras 4, 5 y 2.1 se muestran las diferencias en crecimiento y desarrollo de plantas, hojas y raíces en plántulas cultivadas con sacarosa, glucosa, fructosa al 1.5 y 3%.

En general las plantas cultivadas con glucosa al 3% aparentemente presentaron mayor vigor en el desarrollo de sus hojas y raíces. Por el contrario las plantas cultivadas con sacarosa al 1.5% mostraron una pronunciada elongación en sus tallos y un área foliar reducida y clorótica, así como el número de raíces. Las plantas cultivadas con fructosa presentaron un bajo crecimiento asociado con ciertas alteraciones morfológicas.

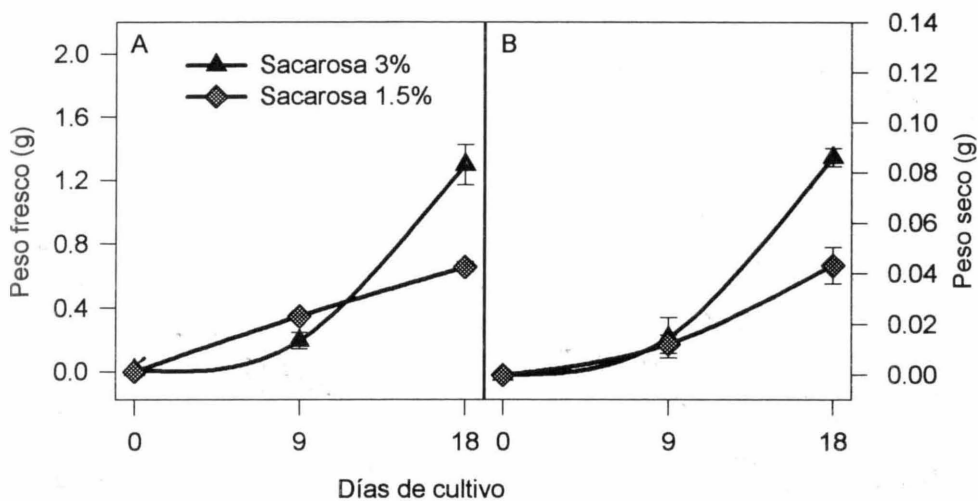


Figura 2.1 Evaluación de (A) Peso fresco y (B) Peso seco en plantas de *T. erecta* micropropagadas con sacarosa al 1.5 y 3%. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas y las barras  $\pm$ , la desviación estándar. En el caso donde las barras no son visibles, es porque son menores a los símbolos.

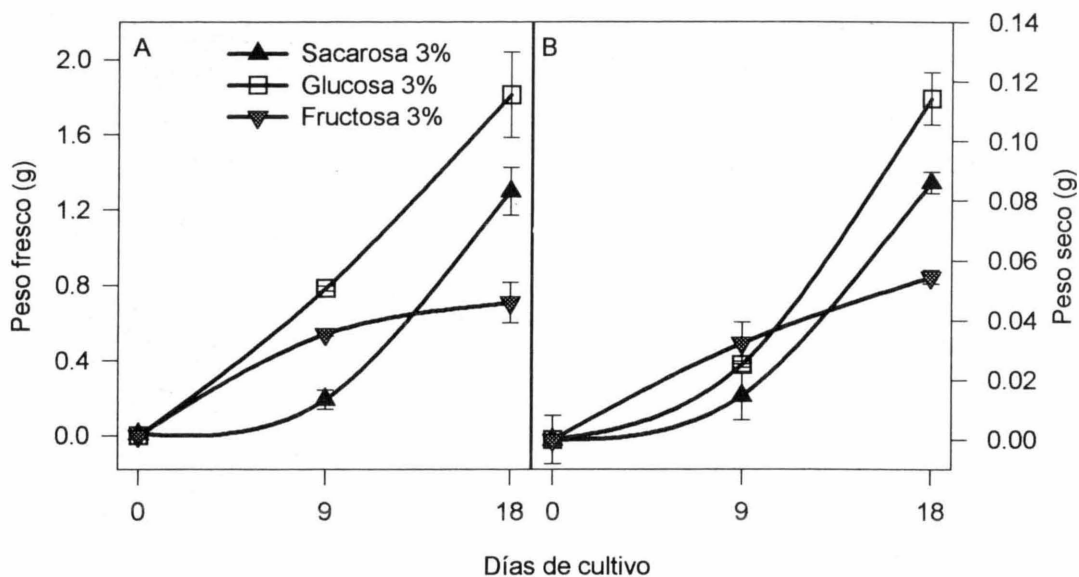


Figura 2.2. Evaluación de: (A) peso fresco y (B) peso seco en plantas de *T. erecta* micropropagadas con sacarosa, glucosa y fructosa al 3%. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas y las barras  $\pm$ , la desviación estándar. En el caso donde las barras no son visibles, es porque son menores a los símbolos.

## Enzimas carboxilantes (PEPc y Rubisco)

En las figuras (2.3, 2.4) se muestran los resultados obtenidos de las actividades enzimáticas (PEPc y Rubisco), además del contenido de proteínas totales registrado durante el ciclo de 24 h.

Como se observa (Fig. 2.3.A) en plantas de campo y micropropagadas con sacarosa al 1.5%, la actividad de PEPc registrada presentó niveles muy abatidos tanto en día como en la noche de  $0.005\text{--}0.0042 \text{ mmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de proteína, respectivamente. En ambos tratamientos mostraron un comportamiento similar.

Las plantas cultivadas en presencia de sacarosa al 3% mostraron una actividad elevada de PEPc, a las 8:00 AM de  $0.045 \text{ mmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de proteína. Posteriormente, se registró un descenso a partir de las 12:00 PM permaneciendo en los niveles bajos de  $0.010 \text{ mmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de proteína, es decir durante la tarde y noche.

Las plantas cultivadas con glucosa y fructosa presentaron una mayor actividad de PEPc. Esta fue de 0.05 y  $0.08 \text{ mmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de proteína, respectivamente. Posteriormente, se registró un descenso a las 16:00 PM, donde permaneció en niveles bajos, oscilando dentro en un rango de 0.01 y  $0.02 \text{ mmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de proteína.

Como se observa, las plantas cultivadas con sacarosa y glucosa al 3%, presentaron un comportamiento similar. Cabe señalar, que las plantas cultivadas con fructosa al 3% mostraron una mayor actividad de PEPc en comparación con los demás tratamientos.

Por lo tanto, a concentraciones elevadas de sacarosa, fructosa y glucosa se favorece una actividad alta de PEPc en plantas de *T. erecta* cultivada *in vitro*.

La actividad de rubisco (Fig. 2.3 B) registrada en las plantas de campo, mostraron una máxima actividad a las 8:00 AM de  $0.75 \text{ mmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de proteína. Posteriormente, hay un descenso a partir de 12:00 AM permaneciendo en sus niveles bajos de  $0.35 \text{ mmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de proteína.

Las plantas cultivadas con sacarosa al 1.5 y 3% presentaron un pico de actividad de rubisco máxima a las 8:00 AM de 0.20 y  $0.25 \text{ mmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de proteína, respectivamente. Más adelante, se registró una disminución, permaneciendo en sus niveles más bajos con  $0.009 \text{ mmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de proteína. En ambos tratamientos se presentó un comportamiento similar.

La presencia específicamente de sacarosa parece reducir la actividad de Rubisco en plantas *T. erecta* micropropagadas.

Las plantas que fueron cultivadas en presencia de glucosa y fructosa (fig. 2.4) al 3% mostraron un pico de máxima actividad de Rubisco a las 8:00 AM de 0.36 y  $0.27 \text{ mmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de proteína, respectivamente. En Ambos sistemas se presentó un comportamiento similar.

Las plantas cultivadas en presencia de fructosa al 3% mostraron una baja actividad de Rubisco en comparación con los demás tratamientos.

Por último, en relación con la actividad enzimática (PEPc y rubisco) en las plantas de campo (Cuadro 2.5) se determinó, que su fijación de CO<sub>2</sub> es autotrófica. Resultados similares se obtuvieron en plantas cultivadas con sacarosa al 1.5%. Sin embargo, las plantas que fueron cultivadas con concentraciones elevadas de sacarosa (3%), la fijación de CO<sub>2</sub> que presentaron no fue autotrófica. Por otro lado, la relación de las actividades enzimáticas de las plantas cultivadas con fructosa y glucosa al 3% mostraron que su fijación de CO<sub>2</sub> no es autotrófica.

La presencia de concentraciones elevadas de fuentes de carbono (sacarosa, glucosa o fructosa) provoca que la fijación de CO<sub>2</sub> no sea autotrófica en plantas micropropagadas.

#### Contenido de proteínas.

En plantas de campo (Fig. 2.3 C y 2.4 C), el contenido de proteínas totales en hojas, mostró un valor de máximo contenido de 124.53 µg g<sup>-1</sup> PF a las 12:00 AM y otro durante la noche de 119.8 µg g<sup>-1</sup> PF a las 24 h del ciclo estudiado.

Un comportamiento similar presentaron las plantas que fueron cultivadas con sacarosa al 1.5%, en las que se obtuvieron valores de máximo contenido de proteínas a las 16:00 PM de 139.05 µg g<sup>-1</sup> PF. En algunas horas del día las plantas cultivadas con sacarosa al 1.5% presentaron mayor contenido al determinado en las plantas de campo. Posteriormente, en ambos tratamientos se registró una disminución conforme transcurrió el día, permaneciendo en sus niveles más bajos.

En cambio, las plantas cultivadas con sacarosa, glucosa y fructosa al 3% presentaron niveles abatidos ubicados dentro de un rango de 16.54, 18.51 y 39.49 µg g<sup>-1</sup> PF, respectivamente. En estos tratamientos, las plantas presentaron un comportamiento similar.

| <b>Contenido de proteínas y actividades enzimáticas</b> |                                            |                                                                                         |                                                                                      |                          |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Parámetros                                              | Contenido de prot. (µg g <sup>-1</sup> PF) | Actividad de rubisco (mmol CO <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> de proteína) | Actividad de PEPc (mmol CO <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> de proteína) | Relación de PEPc/rubisco |
| Campo                                                   | 124.53                                     | 0.75                                                                                    | 0.005                                                                                | *0.007                   |
| Sacarosa 1.5%                                           | 139.05                                     | 0.15                                                                                    | 0.004                                                                                | *0.027                   |
| Sacarosa 3%                                             | 16.54                                      | 0.17                                                                                    | 0.045                                                                                | 0.265                    |
| Glucosa 3%                                              | 18.51                                      | 0.26                                                                                    | 0.05                                                                                 | 0.192                    |
| Fructosa 3%                                             | 39.49                                      | 0.36                                                                                    | 0.08                                                                                 | 0.222                    |

\* Relación de PEPc/Rubisco, indicando la fijación de CO<sub>2</sub> autotrófica para las plantas con metabolismo C<sub>3</sub>.

*Cuadro 2.5 Valores máximos determinados durante un ciclo de 24 h, en el contenido de proteínas totales, actividades enzimáticas (PEPc, Rubisco y relación de PEPc/Rubisco) de plantas cultivadas en campo y micropropagadas con sacarosa, glucosa y fructosa a diferentes concentraciones.*

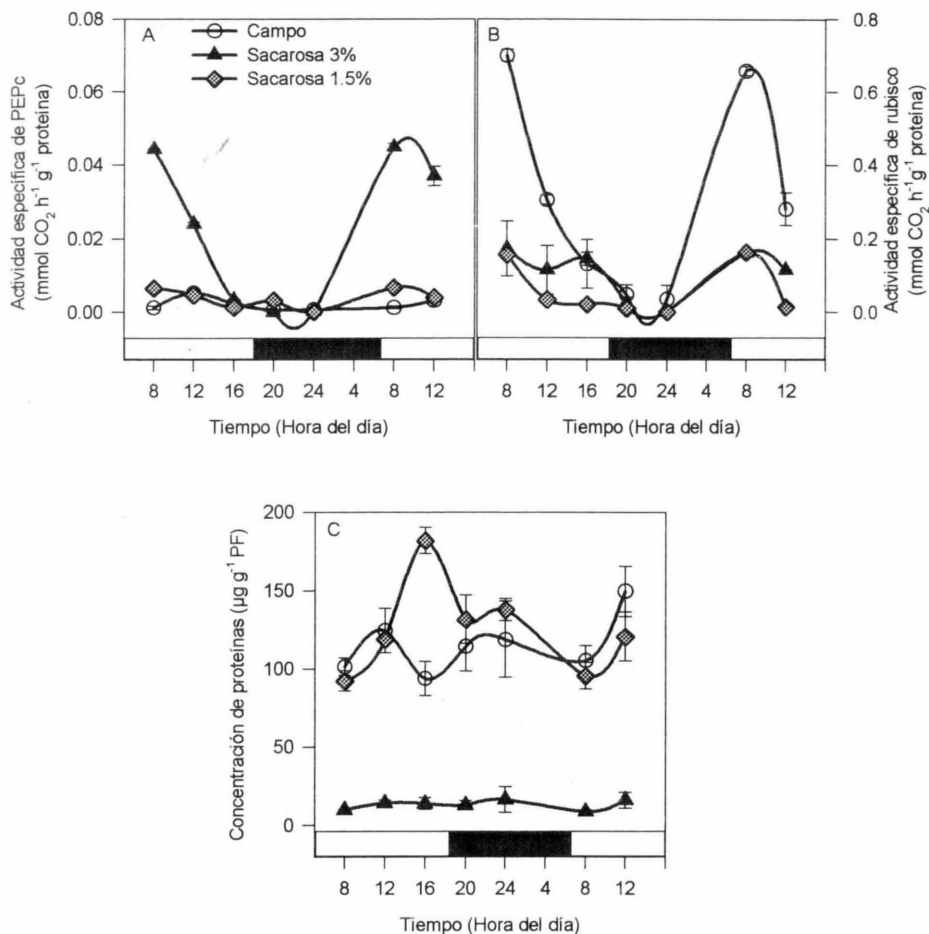


Figura 2.3 Actividades enzimáticas (A) PEPc, (B) Rubisco y (C) contenido de proteínas totales de plantas de *T. erecta* micropropagadas presencia de sacarosa al 1.5 y 3%, además de plantas cultivadas en campo. Las mediciones se realizaron durante un ciclo de 24 h, las barras oscuras muestran el período de oscuridad. Cada punto representa un promedio de 5 réplicas y las barra, la desviación estándar. En el caso donde las barras, no son visibles es porque son menores a los símbolos.

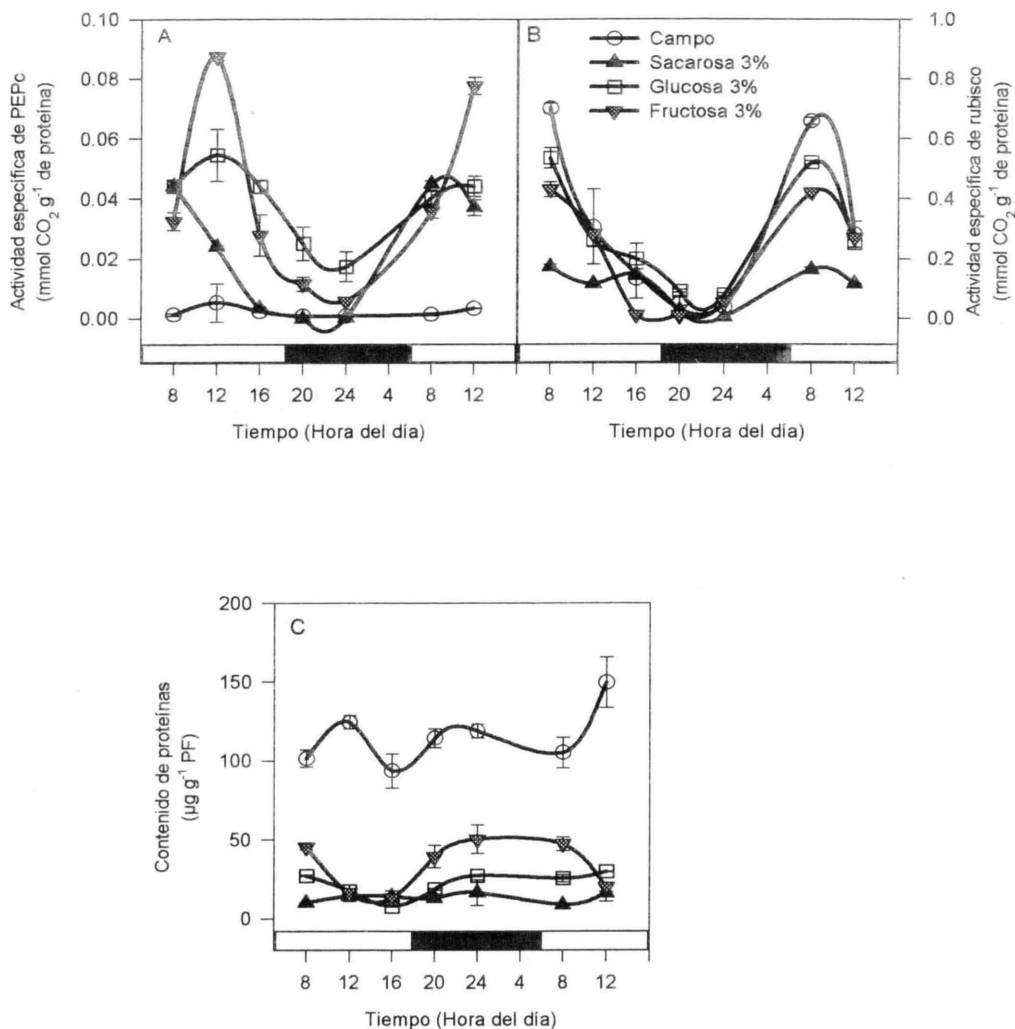


Figura 2.4 Actividades enzimáticas (A) PEPC, (B) Rubisco y (C) contenido de proteínas totales de plantas de *T. erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa, glucosa y fructosa al 3% y de plantas cultivadas en campo. Las mediciones se realizaron durante un ciclo de 24 h, las barras oscuras muestran el período de oscuridad. Cada punto representa un promedio de 5 réplicas y las barras, la desviación estándar. En el caso donde las barras, no son visibles es porque son menores a los símbolos.



## Patrones de proteínas totales

En la figura 2.5 se puede observar un patrón de proteínas totales con las diversas fuentes de carbono a diferentes concentraciones en plantas micropropagadas de *T. erecta*.

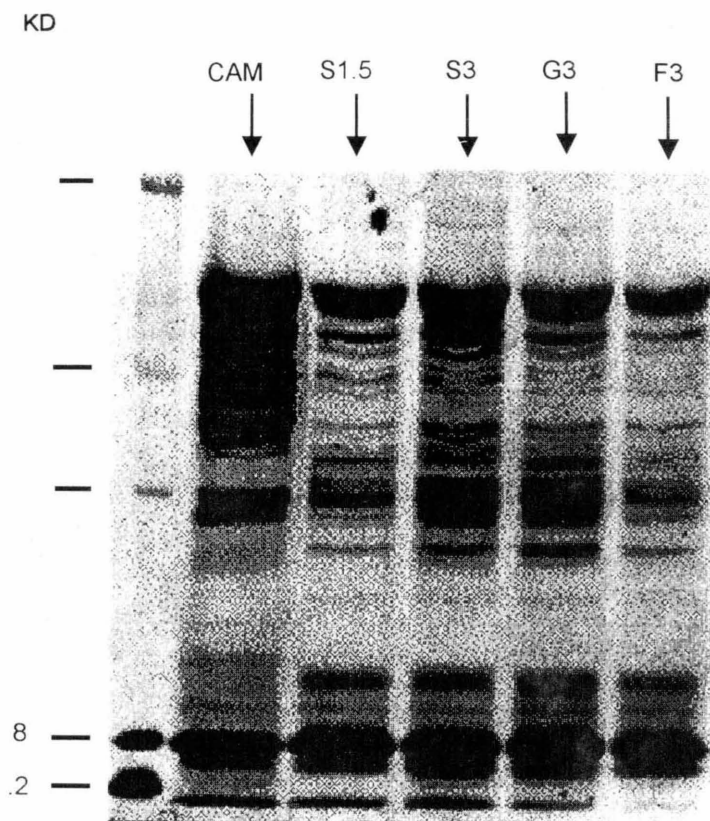
Se determinó una banda intensa y ancha que se encuentra ubicada entre 79.5 y 49.5 kDa, la cual varía entre los diferentes tratamientos. Posiblemente corresponde a alguna subunidad de Rubisco. Sin embargo, en la planta de campo se presenta esta banda se presentó aún más intensa y ancha. En las plantas micropropagadas, específicamente con fructosa al 3%, esta banda es menos intensa y ancha en comparación con los demás tratamientos.

Entre el marcador de 49.5 y 79.5 kDa aparte de la presencia de esta banda ancha e intensa, se ubica otra banda ligeramente abajo, que como observamos en plantas de campo, es intensa y definida, sin embargo en las plantas micropropagadas (sacarosa y glucosa al 3%), la banda es delgada y en otros tratamientos (sacarosa al 1.5%) se mostró aún más ligera y tenue esta banda. E incluso en plantas cultivadas con fructosa esta banda no se presentó.

A partir del marcador de 49.5 kDa, se presentan una serie de bandas que corresponden a ciertas proteínas, en plantas cultivadas en campo. Sin embargo en las plantas micropropagadas sólo se presentan 2 o 3 bandas de proteínas menos intensas, a excepción del carril que corresponde a las plantas cultivadas con fructosa al 3%, en donde son muy pocas las bandas que se presentan.

Alrededor del marcador de 34.8 y 28 kDa se encuentra otras bandas de proteínas que sólo se presentan en las plantas cultivadas *in vitro*. Posiblemente pueda tratarse de la subunidad menor de Rubisco.

La presencia de pocas bandas y menos intensas en las plantas micropropagadas explica la poca cantidad cuantificada de proteínas totales en hojas, registradas durante el ciclo de 24 h.



*Figura 2.5 Patrón de proteínas totales presentes en hojas de plantas cultivadas en campo y micropropagadas con sacarosa 1.5-3%, glucosa 3% y fructosa 3%.*

## Contenido de clorofila

En las Figuras 2.6 y 2.7, se presentan los resultados obtenidos en la determinación de clorofila *a*, *b*, total y las relaciones *a/b*, provenientes de plantas cultivadas en campo y micropropagadas en presencia de sacarosa 1.5-3%, glucosa y fructosa al 3%, durante un ciclo de 24 h (*Cuadro 2.6*).

El contenido de clorofila *a*, fue similar entre las plantas cultivadas en campo y micropropagadas en presencia de sacarosa al 3%. El contenido de clorofila *a* fue de 25 y 30  $\mu\text{g g}^{-1}$  PF, respectivamente.

Las plantas que fueron cultivadas en presencia de sacarosa al 1.5% presentaron un comportamiento oscilatorio, muy inestable, en comparación con los otros dos tratamientos ya mencionados; el contenido de clorofila *a*, osciló entre 12 y 24 30  $\mu\text{g g}^{-1}$  PF.

Las plantas cultivadas en presencia de glucosa al 3%, el contenido de clorofila *a* que presentaron se mantuvo estable con valores de 23 y 27  $\mu\text{g g}^{-1}$  PF, en algunos puntos el contenido presente fue menor que el mostrado por los demás tratamientos antes descritos (plantas cultivadas con sacarosa 1.5-3% y de campo), a pesar de esto presentaron una tendencia similar. En las plantas cultivadas con fructosa al 3% se determinó, que el contenido de clorofila *a* fue menor, en comparación con los demás tratamientos. Su comportamiento osciló entre 18 y 24  $\mu\text{g g}^{-1}$  PF.

En el contenido de clorofila *b* fue similar entre las plantas cultivadas en campo y micropropagadas en presencia de sacarosa al 3% (29-35  $\mu\text{g g}^{-1}$  PF). Las plantas cultivadas con sacarosa al 1.5% tuvieron un contenido de clorofila *b* bajo de 2-6  $\mu\text{g g}^{-1}$  PF.

Las plantas cultivadas en presencia de glucosa y fructosa al 3% presentaron niveles abatidos (5-7  $\mu\text{g g}^{-1}$  PF), además en ambos tratamientos se mostró una tendencia similar.

En el contenido de clorofila total se mostró una tendencia similar al de la clorofila *b*.

La relación de clorofila *a/b*, en plantas cultivadas en el campo ó micropropagadas en presencia de sacarosa al 3% fue similar y estable alrededor de 0.93 y 1. En las plantas cultivadas con sacarosa al 1.5%, la relación *a/b* aumento. Este aumento es simplemente el reflejo de la drástica disminución registrada en el contenido de clorofila *b*.

Sin embargo, la plantas cultivadas en presencia de glucosa y fructosa mostraron una relación *a/b* elevada, que es el reflejo de la disminución drástica (4.2-2.8) en clorofila *b*.

| Pigmentos     |                                                  |                                                  |                                                                       |                     |
|---------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------|
| Parámetros    | Clorofila <i>a</i><br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ PF) | Clorofila <i>b</i><br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ PF) | Clorofila total [ <i>a</i> + <i>b</i> ]<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ PF) | Relación <i>a/b</i> |
| Campo         | 30                                               | 30.5                                             | 60.5                                                                  | 1                   |
| Sacarosa 1.5% | 24.07                                            | 6.32                                             | 30.39                                                                 | 3.8                 |
| Sacarosa 3%   | 30                                               | 32.6                                             | 62.63                                                                 | 0.93                |
| Glucosa 3%    | 25.21                                            | 7.22                                             | 31.43                                                                 | 3.49                |
| Fructosa 3%   | 24.51                                            | 7.05                                             | 31.56                                                                 | 3.47                |

*Cuadro 2.6.* Valores máximos encontrados durante un ciclo de 24 h, en el contenido de pigmentos y su relación *a/b* de plantas cultivadas en campo y micropropagadas en presencia de sacarosa 1.5-3%, glucosa y fructosa al 3%.

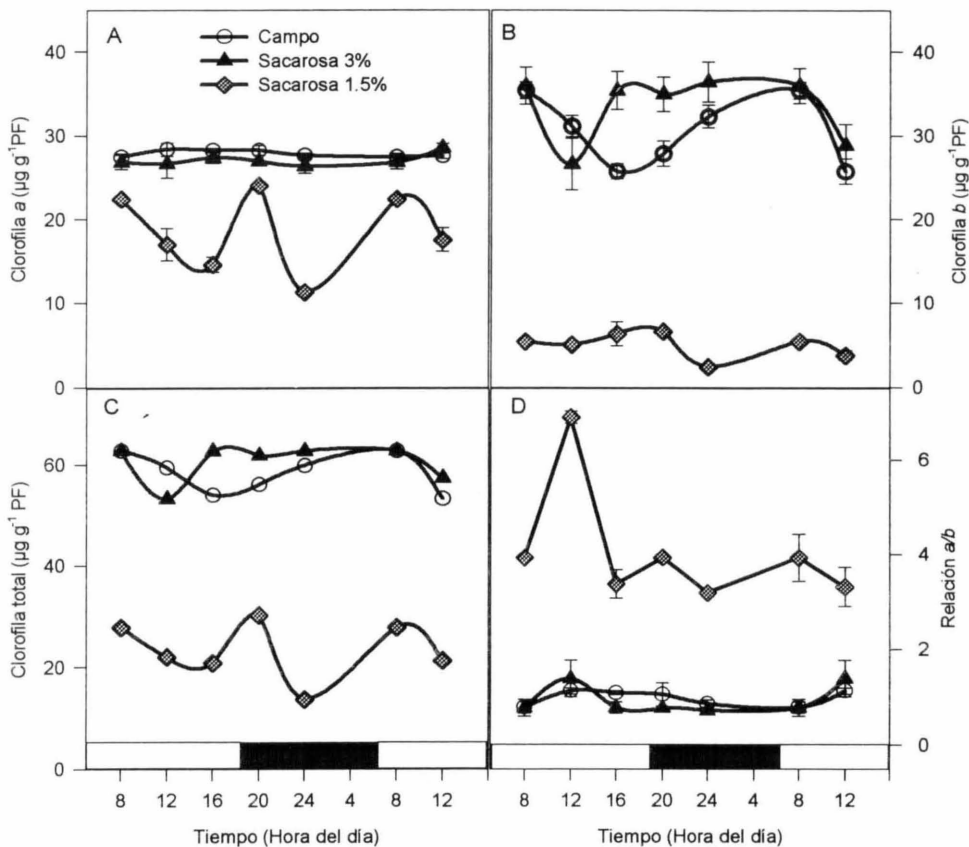


Figura 2.6 Contenido de (A) clorofila a, (B) clorofila b, (c) clorofila total y (D) relación de clorofila a/b en plantas de *T. erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa 1,5 3% y de plantas cultivadas en campo. Las mediciones se realizaron durante un ciclo de 24 h, las barras oscuras muestran el período de oscuridad. Cada punto representa un promedio de 5 réplicas y las barras, la desviación estándar. En el caso de las barras que no son visible, es porque son menores a los símbolos

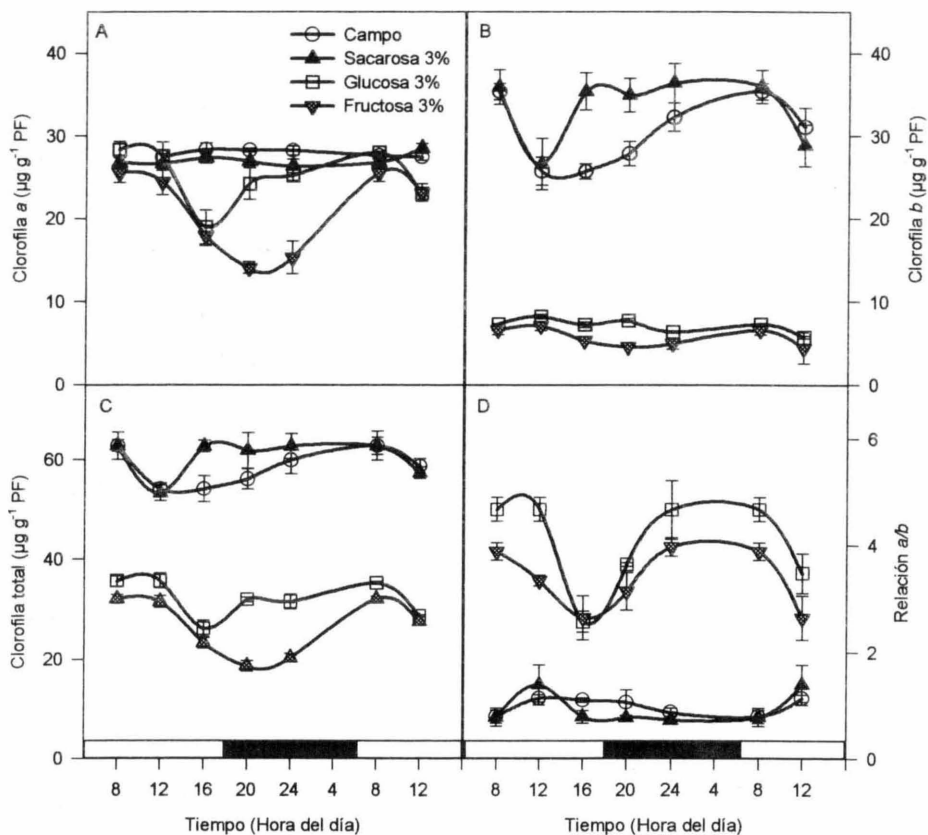


Figura 2.7. Contenido de (A) clorofila a, (B) clorofila b, (c) clorofila total y (D) relación de clorofila a/b en plantas de *T. erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa, glucosa y fructosa 3% y de plantas cultivadas en campo. Las mediciones se realizaron durante un ciclo de 24 h, las barras oscuras muestran el período de oscuridad. Cada punto representa un promedio de 5 réplicas y las barras, la desviación estándar. En el caso de las barras que no son visible, es porque son menores a los símbolos

## Tasas de fijación neta de CO<sub>2</sub>.

Las tasas fotosintéticas (fijación de CO<sub>2</sub>), conductancia estomática, transpiración e intensidad de luz de plantas cultivadas en campo (Fig. 2.8), se determinaron durante un ciclo de 24 h, lo que permitió evaluar el comportamiento de dichas tasas bajo condiciones tanto de luz como de oscuridad.

Las plantas cultivadas en campo, presentaron un comportamiento típico de una planta C<sub>3</sub>. Sus tasas de fijación de CO<sub>2</sub> máxima de 13.38  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , durante el período de día con una intensidad de luz de 2,000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 2.8 A). Mientras que durante la noche, las tasas de fijación CO<sub>2</sub> fueron negativas -2.14  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e intensidad de luz PAR de 0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . En el registro de la conductancia estomática (Fig. 2.8 B) se observa que al iniciar el día, hay una conductancia elevada (3  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y posteriormente hay un descenso a 0-35  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  que fue el valor mínimo monitoreado durante la noche, coincidiendo éste con las tasas de fijación de CO<sub>2</sub> más bajas. Además, se calcularon las tasas de transpiración, observándose un comportamiento similar al determinado para la conductancia estomática y la fijación de CO<sub>2</sub> (Fig. 2.8 C y D). Se presentó una transpiración elevada a las 12:00 PM de 3.2  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , es decir cuando se registro la intensidad de luz máxima.

Posteriormente a partir de las 16:00 h de 2  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , llegando a sus niveles más bajos durante la noche con 0  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de transpiración.

Las curvas dosis-respuesta a la luz de las plantas cultivadas en cámaras de crecimiento (las cuales fueron tomadas como plantas de "campo") o micropropagadas en presencia de sacarosa al 1.5-3%, glucosa y fructosa al 3% (Fig. 2. 9 y 2.10).

Como se ha descrito, las plantas cultivadas *in vitro* en presencia de sacarosa al 3% mostraron tasas de respiración de -13.45  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante el período de oscuridad.

A la intensidad de luz de 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mostraron tasas de respiración de -4.68  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Este punto es importante ya que es la intensidad de luz que generalmente es utilizada para los cuartos de crecimiento en cultivo de tejidos.

Sin embargo, al aumentar la intensidad de luz gradualmente, también se incrementan las tasas de fijación neta de CO<sub>2</sub>, llegando sus máximas tasas de 14.78  $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con una intensidad de luz de 1,500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

En el caso de las plantas cultivadas en las cámaras de crecimiento y micropropagadas con sacarosa al 1.5%, presentaron tasas menores de respiración de -2.23 y -1.07  $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente durante el período de oscuridad.

A diferencia de las tasas de respiración presentadas por las plantas micropropagadas con sacarosa al 3%, a la intensidad de luz de los cuartos de

cultivo:  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , las plantas micropropagadas con sacarosa al 1.5% presentaron tasas de fotosíntesis positivas de  $1.67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Además, tanto las plantas cultivadas en las cámaras de crecimiento como las plantas micropropagadas con sacarosa al 1.5%, mostraron un comportamiento similar, llegando a tasas con valores máximos en la fijación neta de  $\text{CO}_2$  de  $14.31$  y  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente a una intensidad de luz de  $1,500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Después hay un descenso que parece estar asociado a una posible fotoinhibición a  $2,000 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz.

Las plantas cultivadas en presencia de glucosa y fructosa al 3% presentaron durante el período de oscuridad, tasas de respiración de  $-6$  y  $-5.7 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente. A la intensidad de luz utilizada en los cuartos de crecimiento de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , estas plantas continuaron presentando tasas de respiración, aunque menores que las obtenidas en las plantas cultivadas con sacarosa al 3% ( $-2.3$  y  $-2.6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Al aumentar la intensidad de luz, su fijación de  $\text{CO}_2$  neta incrementaba gradualmente, llegando a sus tasas de máxima fijación de  $20.8$  y  $18.5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente con una intensidad de luz de  $1,500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Sin embargo, después de este punto hay una disminución en la fijación de  $\text{CO}_2$ , la cual parece estar asociada a una posible fotoinhibición por un exceso de luz, similar a la tendencia, fue mostrada por los tratamientos antes mencionados.

Las tasas de conductancia estomática (Fig. 2.11 y 2.12) de las plantas cultivadas en las cámaras de crecimiento fueron elevadas y conforme aumentaba la intensidad de luz, también incrementaba la conductancia llegando a sus máximas tasas de  $3.2 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con una intensidad de luz de  $1,500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Posteriormente hay un descenso de  $2.9 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Las plantas micropropagadas en presencia de sacarosa 1.5 y 3% mostraron una conductancia estomática baja ( $0.12$  y  $0.24 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), en comparación con las determinadas en las plantas cultivadas en las cámaras de crecimiento.

Las plantas cultivadas con glucosa y fructosa, presentaron tasas de conductancia estomática elevadas de  $1.7$  y  $1.45 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  respectivamente, con una intensidad de luz de  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Cabe señalar que en estas plantas, la conductancia estomática que mostraron fue abatida como se había registrado en las plantas cultivadas en presencia de sacarosa 1.5 y 3%.

La temperatura (fig. 2.13 y 2.14 A) y la humedad relativa (fig. 2.13 y 2.14 B), presentaron un comportamiento similar y estable a lo largo de la prueba.



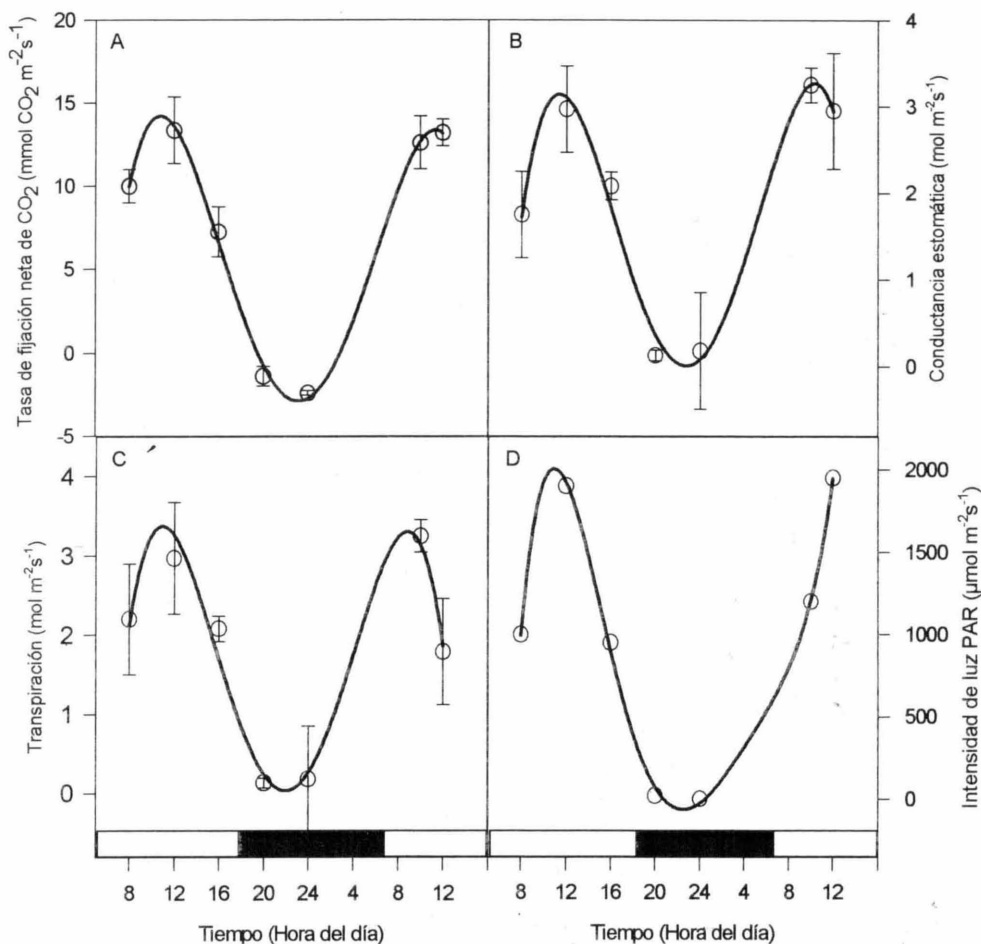


Figura 2.8. Tasas de fijación neta de  $\text{CO}_2$  (A), conductancias estomáticas (B), transpiración (C) e intensidad de luz (PAR) de plantas de *T. erecta* cultivadas en campo. Las mediciones se realizaron, durante un ciclo de 24 h, en donde la barra obscura representa el período de oscuridad. Cada punto representa un promedio de 5 réplicas y las barras, la desviación estándar. En el caso donde las barras no son visibles, es porque son menores a los símbolos.

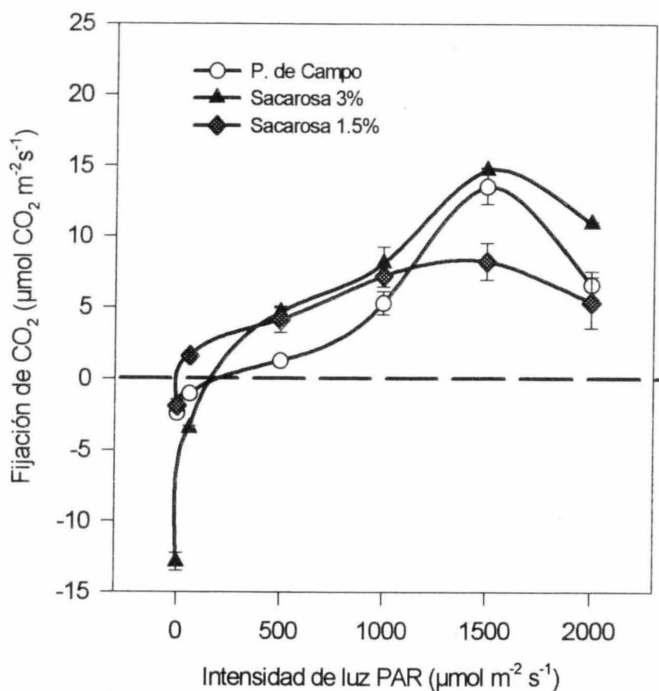


Figura 2.9. Tasas de fijación neta de  $\text{CO}_2$  de plantas de *T. erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa 1.5, 3% y plantas cultivadas en cámaras de crecimiento. Las mediciones se realizaron, durante un ciclo de 24 h, en donde la barra obscura representa el período de oscuridad. Cada punto representa un promedio de 5 réplicas y las barras, la desviación estándar. En el caso donde las barras no son visibles, es porque son menores a los símbolos.

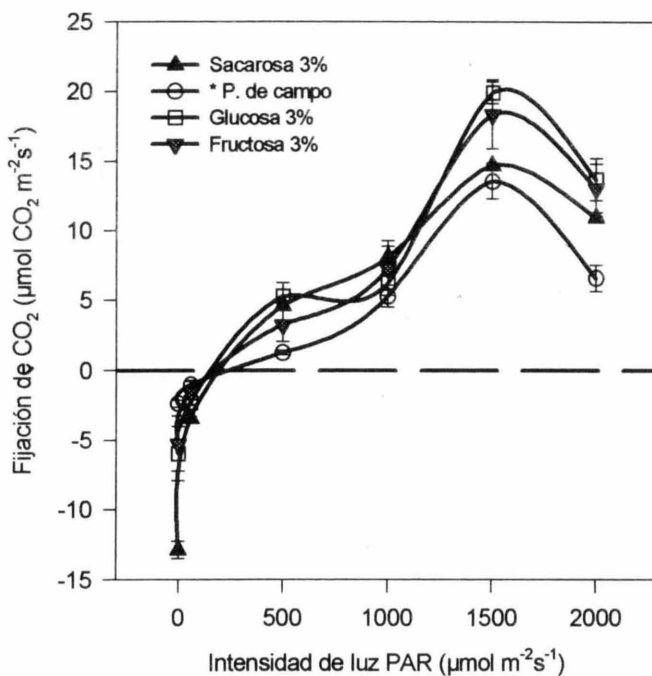


Figura 2.10. Tasas de fijación neta de  $\text{CO}_2$  de plantas de *T. erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa, glucosa y fructosa al 3% y de plantas cultivadas en cámaras de crecimiento (las cuales fueron tomadas como plantas de "campo"). Las mediciones se realizaron, sometiendo las plantas, a diferentes intensidades de luz PAR (PPDF). Cada punto representa un promedio de 5 réplicas y las barras, la desviación estándar. En el caso de las barras que no son visibles, es porque son menores a los símbolos

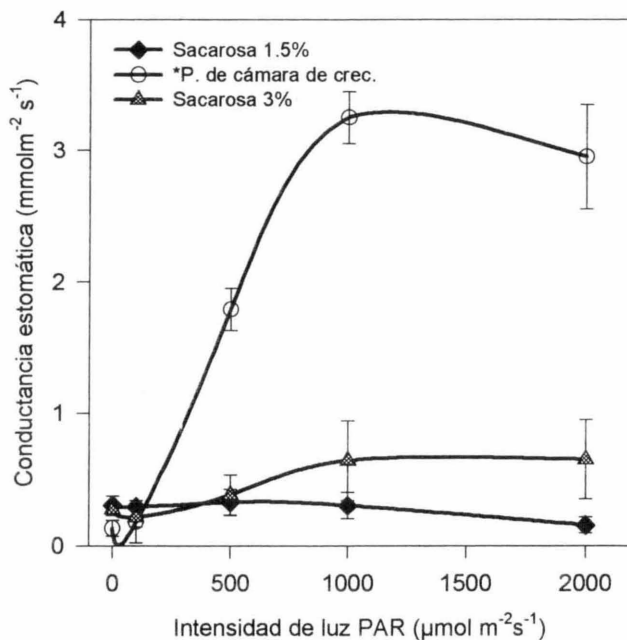


Figura 2.11. Conductancia estomática de plantas de *T. erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa 1.5, 3% y plantas cultivadas en cámaras de crecimiento. Las mediciones se realizaron, durante un ciclo de 24 h, en donde la barra oscura representa el período de oscuridad. Cada punto representa un promedio de 5 réplicas y las barras, la desviación estándar. En el caso donde las barras no son visibles, es porque son menores a los símbolos.

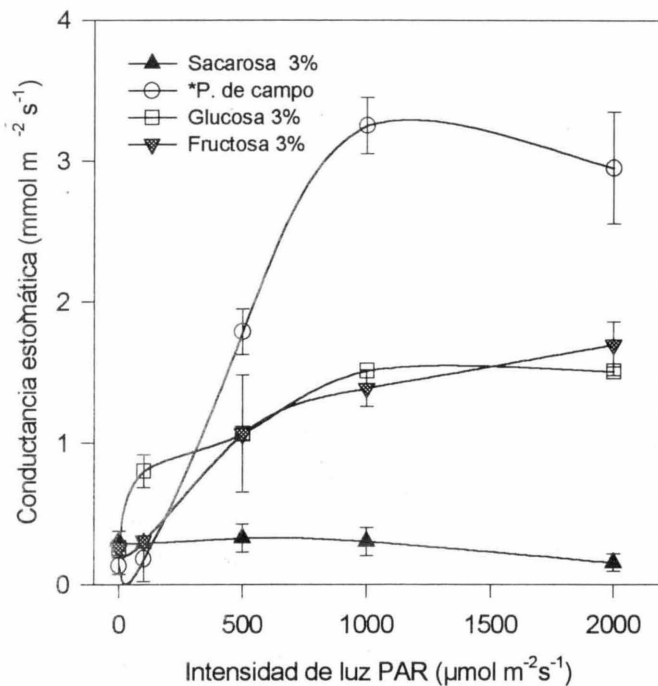


Figura 2.12. Tasas de conductancias estomáticas de plantas de *T. erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa, glucosa y fructosa al 3% y de plantas cultivadas en cámaras de crecimiento (las cuales fueron tomadas como plantas de "campo"). Las mediciones se realizaron, a diferentes intensidades de luz PAR (PPDF). Cada punto representa un promedio de 5 réplicas y las barras, la desviación estándar. En el caso de las barras que no son visibles, es porque son menores a los símbolos.

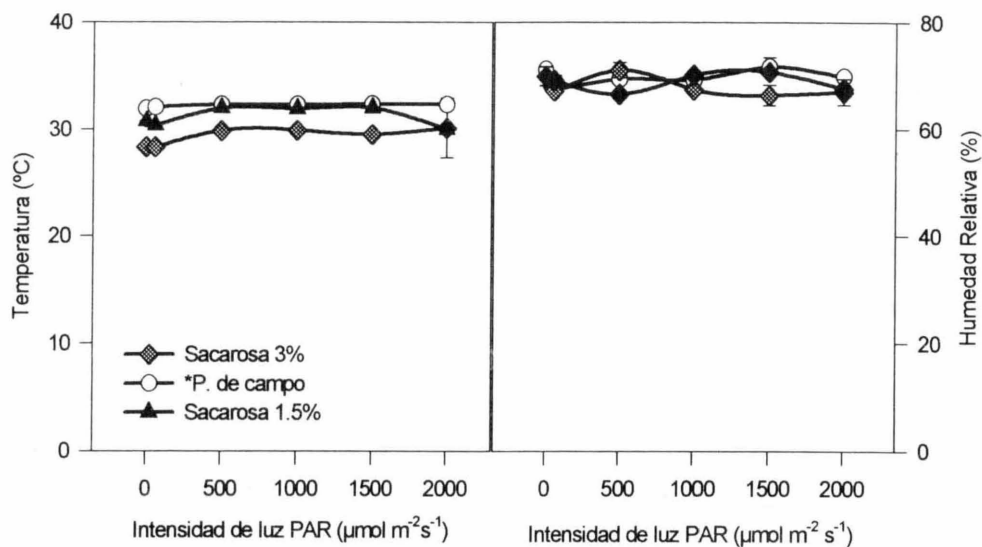


Figura 2.13. Registro de la temperatura (A) y humedad relativa (B) durante el desarrollo de la prueba dosis-respuesta a luz realizado a plantas de *T. erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa 1.5, 3% y plantas cultivadas en cámaras de crecimiento. Las mediciones se realizaron, durante un ciclo de 24 h, en donde la barra obscura representa el período de oscuridad. Cada punto representa un promedio de 5 réplicas y las barras, la desviación estándar. En el caso donde las barras no son visibles, es porque son menores a los símbolos.

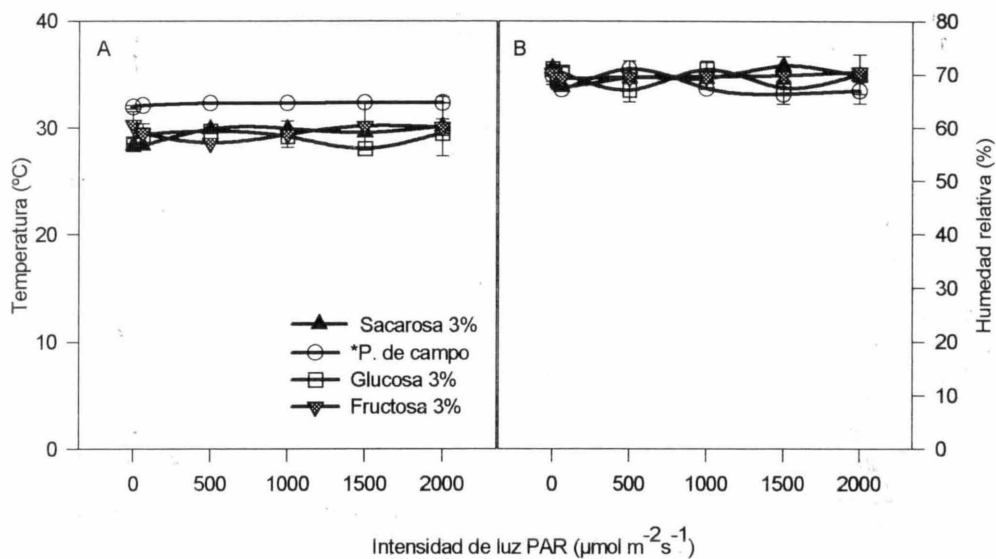


Figura 2.14. Registro de: temperatura (A) y humedad relativa (B) durante el desarrollo de la prueba de dosis-respuesta a luz, realizado en plantas de *T. erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa, glucosa y fructosa al 3% y de plantas cultivadas en cámaras de crecimiento (las cuales fueron tomadas como plantas de "campo"). Las mediciones se realizaron sometiendo las plantas a diferentes intensidades de luz PAR (PPDF). Cada punto representa un promedio de 5 réplicas y las barras, la desviación estándar. En el caso de las barras que no son visibles, es porque son menores a los símbolos

## DISCUSIÓN

### A. Planta de campo

De acuerdo a las evidencias mostradas en esta tesis, *Tagetes erecta* cultivada en campo presenta un metabolismo del carbono tipo  $C_3$ . Esta afirmación está basada en dos hechos: el análisis de enzimas carboxilantes, indican que la Rubisco es la enzima encargada de fijar de  $CO_2$  atmosférico, mostrando una actividad máxima durante el día y nula en la noche, similar a lo determinado en plantas de frijol, según Keys *et al.*, 1995. La actividad de la otra enzima PEPc se encuentra en niveles abatidos durante el día y la noche, lo que concuerda para las plantas con metabolismo del carbono tipo  $C_3$ . Bjorkman, *et al.*, (1976); Hague y Sims (1980) reportan que una característica de las plantas  $C_3$  es la baja actividad y cantidad de PEPc.

La relación de las actividades PEPc/Rubisco, es la esperada para las plantas  $C_3$  (Hanson y Edelman, 1972; Rogers *et al.*, 1987; Widholm, 1992). En segundo lugar, el contenido (a y b) se presentó un comportamiento estable. La relación a/b se encontró que está dentro del rango reportado para las plantas  $C_3$  (Salisbury y Ross, 1979).

La fijación de  $CO_2$  por las plantas de *T. erecta* cultivada en campo muestra un pico máxima a las 12:00 AM, es una característica más de las plantas  $C_3$  (Lawlor, 1993).

Sin embargo este pico de máxima fijación de  $CO_2$  no coincide con las horas de máxima actividad de Rubisco (8:00 AM). Una explicación a este fenómeno, en primer lugar se recordará la enzima Rubisco, se regula fuertemente por luz y a las 12:00 AM la intensidad de luz es de  $2000 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ , suficiente para inhibir su actividad (Woodrow y Berry, 1988).

Sin embargo, a pesar de lo anterior la tasa neta de fijación de  $CO_2$  al mediodía permanece elevada, no encontrando hasta la fecha un comportamiento similar.

En estas plantas se determinó que la actividad de Rubisco es muy similar al censo temporal de cambios que ocurren en la conductancia estomática, como han sido reportado por varios autores (Seeman *et al.*, 1988; Woodrow y Mott, 1989).

### Efecto de sacarosa exógena sobre el crecimiento

Los resultados obtenidos del desarrollo de las semillas germinadas *in vitro* de *Tagetes erecta*, muestran que la fuente de carbono, específicamente sacarosa, es de suma importancia para el crecimiento y desarrollo de los tejidos de esta especie, ya que en su ausencia, las plántulas fueron incapaces de



crecer y en algunas ocasiones presentaron problemas morfológicos: como clórosis, vitrificación, etc.

Otros autores también reportan que en ausencia de una fuente de carbono para ciertas especies, se pueden producir graves daños a la fisiología y morfología de las plantas, entre los que se encuentran la hiperhidricidad y la vitrificación (Maretzki *et al.*, 1974; Street y Shillito, 1977; Street *et al.*, 1978; Wareing y Phillips, 1978; Dalton, 1980; Preece y Sutter, 1991; Lipavská y Vnegenhil, 1996). Se ha reportado que el crecimiento de plantas cultivadas bajo condiciones *in vitro* está sostenido por el suplemento de azúcares exógenos adicionados a los medios de cultivo.

### **Plantas cultivadas *in vitro* (sacarosa 3%)**

Se observó que la adición de altas concentraciones de sacarosa (3%) en el medio de cultivo produce un efecto positivo sobre la formación de biomasa y el área de la hoja. Datos similares han sido reportados para varias especies (Cournac *et al.*, 1991; Galzy y Compan, 1992; Paul y Stitt, 1993; Kovtun y Dale, 1995). En estas plantas la cantidad de biomasa producida, aumentó en comparación con las plantas cultivadas con sacarosa al 1.5%.

En las plantas cultivadas con sacarosa al 3%, se observó que existe una correlación positiva entre la concentración del carbohidrato en el medio y la acumulación de materia seca. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores (Hyndamn *et al.*, 1982; Galzy y Compan, 1992).

Sin embargo, un exceso en la concentración de sacarosa (3%) puede ser perjudicial para la actividad de Rubisco. Resultados reportados por varios autores que confirman este tipo de comportamiento (Hagimori *et al.*, 1984; Grout y Donkin, 1987; Hdider y Desjardins, 1995; Hwa-Kwa *et al.*, 1997). Esta baja actividad de Rubisco puede deberse a una desactivación de esta enzima por un aumento en los niveles de los productos fosforilados (particularmente PGA) producidos por las altas concentraciones de sacarosa presentes en el medio de cultivo (Giersch *et al.*, 1980) o a la presencia de componentes generados por el ciclo PCR, los cuales inhiben a Rubisco (Woodrow y Berry, 1988).

Además, la disponibilidad del fósforo inorgánico (Pi) disminuye, lo que conduce a una reducción en la producción de ATP. Esta falta de ATP puede a su vez reducir la actividad de la Rubisco activasa (Portris, 1992) y en consecuencia la activación de Rubisco disminuye, debido a la acidificación del estroma del cloroplasto (Miziorko y Lorimer, 1983) o por la presencia de ciertos inhibidores que se pueden unir al sustrato de la Rubisco.

A concentraciones elevadas de sacarosa se inhibe la síntesis de la Rubisco, específicamente hay una supresión de la subunidad mayor de la Rubisco como ha sido reportado para las suspensiones celulares de *Arachis hypogaea* (Neumann *et al.*, 1989; Groß *et al.*, 1993) y también inhibe o reduce la

síntesis de la subunidad menor de la Rubisco como se ha reportado en plantas de maíz (Sheen, 1994; Van Oosten *et al.*, 1994).

Las plantas *in vitro* cultivadas en concentraciones elevadas de sacarosa (3%), promueven una elevada actividad de PEPc, concordando con resultados publicados anteriormente (Nato *et al.*, 1978; Bender, 1987; Kumar *et al.*, 1988; Hdider y Desjardins, 1995 y Hwa-Kwa *et al.*, 1997). Se ha sugerido que en plantas C<sub>3</sub>, tanto cantidad y actividad PEPc es mínima, sin embargo en cultivo *in vitro* parece tener una función importante debido a que ha observado una elevada actividad durante la división celular activa, que es cuando hay una demanda considerable en la biosíntesis y por lo tanto, la contribución en la fijación de CO<sub>2</sub> a través de la actividad de PEPc es para proveer más esqueletos carbonados para el crecimiento (Nato y Mathieu, 1978; Hüsemann *et al.*, 1984; Rogers *et al.*, 1987; Kumar *et al.*, 1988).

La relación de la tasa de PEPc/Rubisco, aumenta cuando las concentraciones de sacarosa son elevadas, induciendo una fijación de CO<sub>2</sub> no autótrofica, en consecuencia los tejidos presentan bajas tasas de fotosíntesis debido al tipo de crecimiento que presentan (Kozai, 1991).

El contenido de proteínas totales presentes en las hojas mostraron una disminución drástica en presencia de elevadas concentraciones de sacarosa (3%) en el medio de cultivo, en comparación con las plantas de campo. Debido posiblemente, por una inhibición en la síntesis de proteínas asociadas al mecanismo de fijación de CO<sub>2</sub>, como se ha reportado (Sheen, 1994; Van Oosten *et al.*, 1994).

Las plantas micropropagadas con elevadas concentraciones de sacarosa (3%) presentaron un aumento en el contenido de clorofila (*a* y *b*). Datos similares, se han determinado en plantas de avena cultivadas en presencia de sacarosa al 2% en donde se promueve la síntesis de clorofila (Pasqua *et al.*, 1989).

Aunque la mayoría de la literatura ha reportado, que la concentración de sacarosa en el medio no afecta significativamente el contenido de clorofila, nuestros resultados muestran lo contrario (Rahman y Bake, 1988).

Los resultados obtenidos en esta tesis contradicen lo reportado en la literatura, debido a que bajo estas condiciones de:

- 1). Baja intensidad de luz
- 2). Elevada concentración de sacarosa

Se demostró que se promueve la síntesis de clorofilas en esta especie micropropagada.

Además, se determinó que las plantas cultivadas con concentraciones elevadas de sacarosa (3%) presentaron tasas elevadas de respiración, como resultado principalmente de dos factores:

- a). La presencia de este carbohidrato y

b). El período de oscuridad.

Se han reportado resultados similares en plantas de *Nicotiana tabacum* (Solárová, 1989).

A la intensidad de luz (PAR) de los cuartos de cultivo ( $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), estas plantas mostraron tasas de fotosíntesis negativas (respiración). Por lo tanto, estas plantas son incapaces de desarrollar su capacidad fotosintética a pesar de contar con ella y en consecuencia presentan un crecimiento hetero o mixotrófico, dependiendo totalmente de los carbohidratos adicionados al medio de cultivo (Gibson, 1967; Kozai *et al.*, 1986).

Los resultados obtenidos muestran un punto de máxima saturación de fotosíntesis a una intensidad de luz PAR de  $1,500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Así, se observa que la asimilación neta de  $\text{CO}_2$  se incrementa con cambios en los niveles de luz.

Sin embargo, a partir de  $2,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  las plantas parece no responder, resultando en una disminución en sus tasas de fijación de  $\text{CO}_2$ . Esto puede deberse a que ocurre una fotoinhibición, provocada por un incremento drástico en la intensidad de luz y en consecuencia hay daños al tejido expuesto, por lo tanto disminuyen las tasas de fotosíntesis. Similares resultados se han reportado por otros autores (Lee *et al.*, 1985, Serret *et al.*, 1996).

Por lo tanto, se considera que la deficiencia o el exceso en la intensidad de luz es un factor medio ambiental importante, que limita la fotosíntesis de estas plantas (Lawlor, 1995).

Aunque se presentaron tasas de conductancias estomáticas bajas, estas plantas fueron capaces de asimilar  $\text{CO}_2$  casi tan eficientemente como las plantas que fueron cultivadas en las cámaras de crecimiento. En otras especies, como *Amaranthus edulis* L. cultivada *in vitro*, también presentaron tasas elevadas de la fijación de  $\text{CO}_2$  y conductancias estomáticas bajas (Blechsmidt-Schneider *et al.*, 1989).

Sin embargo, las bajas conductancias estomáticas registradas posiblemente sean el resultado de los cambios en las condiciones ambientales: como la humedad relativa baja (60-85%) y las diferentes intensidades de luz ( $0-2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Varios autores han propuesto que la conductancia estomática sólo es baja en respuesta a cambios en los niveles de luz (Kirschbaum y Pearcy, 1988; Kirschbaum *et al.*, 1988; Schneider *et al.*, 1991). Sin embargo, aunque se determinaron bajas tasas estomáticas, la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  no se alteró, no perdiendo en su totalidad la capacidad para su intercambio gaseoso (Desjardins, 1995).

### **Plantas cultivadas *in vitro* con sacarosa al 1.5%**

Las plantas cultivadas con sacarosa al 1.5% mostraron una menor producción en biomasa durante su crecimiento *in vitro*, en comparación con las

plantas cultivadas con sacarosa al 3%. Como se observa en estas plantas, la concentración de la fuente de carbono exógena es un factor que limita su crecimiento (Botha y O' Kennedy, 1998).

La reducción en la concentración de este carbohidrato, adicionado al medio de cultivo producen un efecto negativo sobre la formación de biomasa y el área de las hojas y este fenómeno coincide con el propuesto para otras especies (Cournac *et al.*, 1991; Galzy y Compan, 1992; Paul y Stitt, 1993; Kovtun y Dale, 1995). Por lo tanto, la disminución en la concentración de este carbohidrato es un factor que limita el desarrollo y crecimiento de las plantas (Cournac *et al.*, 1991).

Se ha propuesto, como una posible alternativa para la inducción de un crecimiento autótrofo, la reducción en la concentración de sacarosa adicionada a los medios de cultivo. Sin embargo, en *T. erecta* una disminución de 3 a 1.5% no promueve mayor actividad de la Rubisco, como se había reportado previamente por otros autores en otras especies (Hidder y Desjardins, 1995; Hwa-Kwa *et al.*, 1997).

La reducción en la concentración de sacarosa del 3 al 1.5% efectivamente, disminuyó la actividad de PEPc presentando un comportamiento para este caso similar al registrado por las plantas de campo. Por lo tanto, esta reducción en la concentración de sacarosa favoreció la disminución en la actividad de PEPc, teniendo los primeros indicios de un crecimiento autótrofo, como lo han propuesto varios autores (Kozai, 1991; Desjardins, 1995).

Por lo tanto, el nivel de actividad de PEPc resultó dependiente de la concentración de sacarosa presente el medio de cultivo de *T. erecta*.

La relación de la tasa de PEPc/Rubisco disminuye cuando la concentración de sacarosa presente el medio de cultivo se reduce (3 a 1.5%), favoreciendo así, la fijación de CO<sub>2</sub> autotrófica de las plantas.

Bajo estas condiciones las plantas cultivadas en presencia de sacarosa al 1.5, no mostraron alteración alguna en el contenido de proteínas, incluso su comportamiento en este parámetro fue similar al presentado por las plantas cultivadas en campo. Al parecer, cuando existe una concentración elevada de carbohidratos, el contenido de proteína disminuye, explicable por una inhibición en ciertas proteínas aún no identificadas claramente.

La reducción en la concentración de sacarosa del 3 al 1.5%, provoca una disminución en el contenido de clorofila (a y b), como reportaron Grout y Aston (1978); Pasqua *et al* (1989).

La disminución en la concentración de sacarosa (1.5%), promueve menores tasas de respiración durante el período de oscuridad, en comparación con las tasas de respiración presentadas por las plantas que fueron cultivadas con concentraciones elevadas de sacarosa (3%).

Un punto para destacar fue que a la intensidad de luz PAR de los cuartos de cultivo (60-100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), las plantas presentaron tasas de fotosíntesis positivas.

Esto es un hecho importante, porque si el objetivo en el cultivo de tejidos es la producción masiva de plantas con un estatus autotrófico, es decir un crecimiento independiente de los carbohidratos exógenos presentes en el medio de cultivo, la reducción en la concentración de sacarosa, como fuente de carbono, parece ser la alternativa más viable. Otra posible alternativa, es incrementar la intensidad de luz PAR de los cuartos de cultivo, suficiente para obtener plantas más vigorosas y con mayor grado de autotrofia, con el objetivo a largo plazo de obtener una sobrevivencia total de estas plantas al momento de ser transferidas a campo.

Posteriormente se registró un punto de máxima saturación de fotosíntesis a una intensidad de luz de  $1,500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Así, la asimilación neta de  $\text{CO}_2$  incrementó con cambios en los niveles de luz. Sin embargo, a partir de  $2,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , las plantas parecen no responder y por lo tanto, disminuyen sus tasas de fijación de  $\text{CO}_2$ . Debido posiblemente a que ocurre una fotoinhibición, provocada por un incremento drástico en la intensidad de luz y en consecuencia hay daños al tejido expuesto, similares resultados se han reportado (Lee *et al.*, 1985, Serret *et al.*, 1996).

Finalmente, la deficiencia o el exceso en la intensidad de luz es un factor importante, que limita la fotosíntesis de estas plantas (Lawlor, 1995).

Aunque presentaron tasas bajas de conductancias estomáticas, estas plantas fueron capaces de asimilar el  $\text{CO}_2$ , casi tan eficientemente como las plantas que fueron cultivadas en las cámaras de crecimiento. Este mismo mecanismo lo presentaron otras especies, como *Amaranthus edulis* cultivada *in vitro*, con altas tasas de fijación de  $\text{CO}_2$  y bajas conductancias (Blechsmidt-Schneider *et al.*, 1989).

Sin embargo, las bajas conductancias registradas, pueden ser el resultado de las condiciones ambientales:

- i). Humedad relativa más baja (60-85%)
- ii). Diferentes intensidades de luz ( $0-2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

Varios autores han propuesto que la conductancia estomática sólo es baja en repuesta a cambios en los niveles de luz (Kirschbaum y Percy, 1988; Kirschbaum *et al.*, 1988; Schneider *et al.*, 1991).

En estas plantas, la capacidad fotosintética esta limitada principalmente por dos factores: deficiencia en la luz, los nutrientes (sacarosa) presentes en los medios de cultivo y adicionalmente por la deficiencia de las enzimas carboxilantes (Hdider y Desjardins, 1994).

### **Plantas cultivadas *in vitro* con glucosa y fructosa 3%**

En general, la sacarosa, glucosa o fructosa o una combinación en cualquiera de estos carbohidratos puede ser usado como fuente de carbono en

el medio de cultivo y de energía para las plantas *in vitro*. Las plantas de *T. erecta* cultivadas en presencia de glucosa (al 3%) mostraron una mayor producción en biomasa durante su crecimiento, al igual que lo reportado en células de *Chenopodium rubrum*, en donde se observó un incremento más rápido cuando se adicionó al medio glucosa como fuente de carbono (Shäfer *et al.*, 1992). En las plantas de *T. erecta* se determinó un efecto positivo en crecimiento cuando se suministro glucosa como fuente de carbono, estimándose su eficiencia para utilizar este tipo de carbohidrato. Se ha reportado que en concentraciones elevadas de glucosa y sacarosa (al 3-5%), inducen pesos frescos elevados en las plántulas de *Quercus suber* (Romano *et al.*, 1995). Por lo tanto, el aumento en peso seco pudiera dar indicio de la gran eficiencia de la glucosa para ser metabolizada como fuente de carbono en diferentes especies, como ha sido reportado por Schäfer *et al.*, 1992.

Las plantas cultivadas en presencia de fructosa mostrando una menor producción de biomasa al ser comparadas con las plantas cultivadas con sacarosa y glucosa al 3%. Esto probablemente se encuentre asociado a que en ciertas especies tienen preferencia por glucosa como fuente de carbono (Oka y Ohyama, 1986; Welander *et al.*, 1989; Temblay y Ladonde, 1984). Además se determinó una correlación positiva entre la concentración del carbohidrato presente en el medio de cultivo y la acumulación de materia seca (Hyndamn *et al.*, 1982; Galzy y Compan, 1992).

En consecuencia, la adición de glucosa como fuente carbono mostró un efecto positivo sobre la formación de biomasa y del área de las hojas de las plantas, similar lo reportado en otras especies (Tichá *et al.*, 1998).

Por los resultados obtenidos se puede decir, que el crecimiento de las plantas de *T. erecta* cultivadas *in vitro* está fuertemente influenciado por los siguientes factores:

1. El tipo de fuente de carbono adicionada al medio de cultivo.
2. La concentración de la fuente de carbono exógena.
3. La eficiencia en la metabolización de la fuente carbono.

Cuando se reemplazó la fuente de carbono tradicional (sacarosa) por glucosa y fructosa, se observó que la actividad de Rubisco aumentó; estos resultados son contrarios a lo observado en otras especies. Se ha reportado un efecto contrario en presencia de glucosa exógena debido a que afecta ligeramente la actividad de Rubisco, el cultivo de células de *Dianthus caryophyllus* (Avelange *et al.*, 1990). Otros autores determinaron que la adición de concentraciones elevadas de glucosa (3-5%), disminuye la actividad Rubisco, así como de otras enzimas del ciclo de Calvin, en hojas maduras de *Spinacia oleracea* y en células de *Chenopodium rubrum* (Krapp *et al.*, 1991; Schäfer *et al.*, 1992).

La actividad de PEPc registrada en plantas cultivadas con los carbohidratos reductores (glucosa o fructosa al 3%), resultó elevada, en comparación con la presentada por las plantas micropropagadas en concentraciones elevadas de sacarosa.

Por lo tanto, los azúcares reductores inducen una actividad elevada de esta enzima. Como se ha reportado, una de las principales características mostradas por las plantas cultivadas *in vitro*, es una actividad elevada de PEPc, la cual es estimulada, en general por los carbohidratos que son fuentes de carbono a concentraciones específicamente elevadas (glucosa, fructosa y sacarosa), como es este caso.

En el cultivo de células *in vitro*, también se ha determinado una actividad elevada de PEPc (Neuman y Bender, 1987), callos (Plums-Dhindsa *et al.*, 1979) y tejidos (Kumar *et al.*, 1988; Desjardins, 1990; Hdider y Desjardins, 1994).

Concluyendo, que los niveles de actividad de esta enzima se encuentran determinados por la concentración de los carbohidratos.

La relación de la tasa de PEPc/Rubisco de las plantas cultivadas con concentraciones elevadas de glucosa y fructosa al 3%, indica que la fijación de CO<sub>2</sub> no es autotrófica. Por lo tanto, la alternativa de la utilización de estos carbohidratos para inducir el crecimiento autotrófico, se limita debido a estos resultados.

El contenido de proteínas totales de las plantas cultivadas en presencia de los carbohidratos reductores, como glucosa y fructosa al 3% disminuyó en forma importante. Esta disminución parece estar asociada con la posible degradación de varios grupos de proteínas (Sheen, 1994; Van Oosten *et al.*, 1994).

Las plantas micropropagadas en presencia de concentraciones elevadas de glucosa y fructosa al 3% mostraron que el contenido de clorofila *a* se mantiene constante y estable. Sin embargo, el contenido en clorofila *b* disminuyó de manera considerable y en consecuencia, la relación de clorofila *a/b* se encuentra en niveles mayores en comparación con los determinados en las plantas micropropagadas en presencia de sacarosa al 3% y por las plantas de campo. Estos resultados, confirman los obtenidos por otros autores (Sheen, 1994; Van Oosten *et al.*, 1994).

Estos autores reportan que la presencia de glucosa o fructosa en el medio de cultivo como fuentes de carbono, inducen una reducción en la actividad transcripcional de ciertos genes nucleares asociados con el complejo de clorofila *a/b*. Esta es una posible explicación de la disminución registrada en clorofila de *T. erecta*.

En la literatura, se ha mencionado que la sacarosa inhibe una de las últimas enzimas de la biosíntesis de clorofilas, actualmente también se ha propuesto que la presencia de glucosa reduce el contenido de clorofila, determinado en *Spinacia oleracea* y en células de *Chenopodium rubrum* (Krapp *et al.*, 1991; Schäfer *et al.*, 1992).



Se determinó que las plantas cultivadas en presencia de concentraciones elevadas de glucosa y fructosa (al 3%) presentan tasas de respiración elevadas durante el período de oscuridad. Debido a diversos factores como:

- I). La presencia de carbohidratos y su concentración.
- II). Baja intensidad de luz de los cuartos de cultivo.
- III). Poco ó nulo intercambio gaseoso.

Solárová (1989) y Schäfer *et al* (1992) determinaron que en plantas de tabaco la presencia de concentraciones elevadas de carbohidratos inducen mayores tasas de respiración durante el período de oscuridad.

A la intensidad de la luz (PAR) de los cuartos de cultivo ( $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), las plantas mostraron tasas de fotosíntesis negativas. Por lo tanto, estas plantas son incapaces de desarrollar su capacidad fotosintética a pesar de contar con ella y en consecuencia presentan un crecimiento heterotrófico (Gibson, 1967; Kozai *et al.*, 1986).

Los resultados obtenidos muestran un punto de saturación máxima de fotosíntesis a una intensidad de luz de  $1,500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Así se observa que la asimilación neta de  $\text{CO}_2$  aumento con los cambios en los niveles de luz. Sin embargo, a partir de  $2,000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , las plantas parecen no responder y por lo tanto disminuyen sus tasas de fijación  $\text{CO}_2$ . Probablemente por fotoinhibición (proceso que es causado por incremento drástico en la intensidad de luz, que provoca daños a los tejidos micropropagados expuestos) induciendo finalmente una disminución en las tasas de fijación de  $\text{CO}_2$  (Lee *et al.*, 1985; Serret *et al.*, 1996).

En estas plantas se determinaron tasas de conductividad estomática elevadas en comparación con las presentadas por las plantas cultivadas en presencia de sacarosa al 1.5 y 3%. Por lo tanto, las plantas fueron capaces de asimilar  $\text{CO}_2$  casi tan eficientemente como las plantas que fueron cultivadas en las cámaras de crecimiento.

Las plantas cultivadas en presencia de glucosa y fructosa al 3%, mostraron las más elevadas tasas de asimilación de  $\text{CO}_2$  atmosférico (Rubisco).

En consecuencia la asimilación de  $\text{CO}_2$  se afecta por diversos factores como:

- I) Calidad e intensidad de luz, a la exponen estas plantas, en general puede considerarse inadecuada.
- II) Concentración y tipo de carbohidrato presente en el medio.

Todos estos factores, reducen las tasas de asimilación de las plantas cultivadas bajo condiciones *in vitro*.



## BIBLIOGRAFÍA

- Arditti J** (1979). Aspects of the physiology of orchids. *Adv. Bot. Res.* **7**, 421-655.
- Arnon DI** (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoloxidase in *beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**, 1-15.
- Avelange MH, Sarrey F, Rébillé F** (1990). Effects of glucose feeding on respiration and photosynthesis in photoautotrophic *Dianthus caryophyllus* cells. *Plant. Physiol.* **94**, 1157-1162.
- Azcon-Bieto J** (1983). Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. *Plant Physiol.* **73**, 681-686.
- Azcon-Bieto J** (1986). The control of photosynthesis gas exchange by assimilate accumulation in wheat. In: Marcelle R, Clijsters H, Van Poucke M (Eds). *Biological Control of Photosynthesis* (pp. 231-240). Dordrecht, The Netherlands.
- Bender L, Joy IV. RW, Thorpe TA** (1987). Studies von <sup>14</sup>C glucose metabolism during shoot bud induction in cultured cotyledon explants of *Pinus radiata*. *Physiol. Plant.* **69**, 428-434.
- Björkman O, Boynton J, Berry J** (1976). Comparison of the heat stability of photosynthesis, chloroplast membrane reactions, photosynthetic enzymes, and soluble protein in leaves of heat-adapted and cold-adapted C<sub>4</sub> species. *Carnegie Inst. Washington Yearb.* **75**, 400-407.
- Blechschildt-Schneider, Ferrar P, Osmond CB** (1989). Control of photosynthesis by the carbohydrate level in leaves of the C<sub>4</sub> plant *Amaranthus edulis* L. *Planta* **177**, 515-525.
- Botha CF, O' Kennedy MM** (1998). Carbohydrate utilisation by cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plantarum.* **102**, 429-436.
- Capellades M, Lemeur R, Debergh P** (1991). Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. *Plan Cell, Tissue Organ Cult.* **25**, 21-26.
- Cournac L, Dimon B, Carrier P, Lohou A, Chagvardieff P** (1991). Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated *in vitro* under different conditions of aeration, sucrose supply, and CO<sub>2</sub> enrichment. *Plant Physiol.* **97**, 112-117.
- Dalton CC** (1980). Photoautotrophy of spinach cells in continuous culture: Photosynthetic development and sustained photoautotrophic growth. *J. Exp. Bot.* **31** (122) 791-864.
- Donnelly DJ, Vidaver WE** (1984). Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **109**, 177-181.
- Ernest R** (1967). Effects of carbohydrate selection on the growth rate of freshly germinated *Phalaenopsis* and *Dendrobium* seed. *Am. Orchid. Soc. Bull.* **36**, 1086-1073.

- Ernest R, Arditti J, Healey PL** (1971). Carbohydrate physiology of orchid seedling. II Hydrolysis and effects of oligosaccharides. *Am. J. Bot.* **58**, 827-835.
- Flores HE, Dai Y, Cuello JL, Maldonado-Mendoza IE, Loyola-Vargas VM** (1993). Green roots: Photosynthesis and photoautotrophy in an underground plant organ. *Plant Physiol.* **101**, 363-371.
- George EF** (1993). Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. Exergetics Ltd. England.
- Gibson AH** (1967). Carbon dioxide limitations of plant growth in tube culture, with special reference to legume-nodulation studies. *Aust. J. Biol. Sci.* **20**, 837-842.
- Giersch C, Heber H, Kaiser G** (1980). Intracellular metabolite gradients and flow of carbon during photosynthesis of leaf protoplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **205**, 246-259.
- Glazy R, and Compan D** (1992). Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of vitis plantlets cultured *in vitro*. *Plant cell Tiss. Organ Cult.* **31**.
- GroB U, Gilles F, Bender L, Berghöfer P, Neumann KH** (1993). The influence of sucrose and an elevated CO<sub>2</sub> concentration on photosynthesis of photoautotrophic peanut (*Arachis hypogaea* L. ) cell cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **33**, 143-150.
- Grout BWW, Aston MJ** (1978). Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. II Carbon dioxide fixation and the development of photosynthetic ability. *Hort. Res.* **17**, 65-71.
- Grout BWW, Millam S** (1985). Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. *Ann. Bot.* **55**, 129-131.
- Grout BWN, Price F** (1987). The establishment of photosynthetic independence in strawberry cultures prior to transplanting. In: Ducate G, Jacobs M, Simeon A (eds) *Plant Micropropagation in Horticultural Industries*. pp 55-60. Proc. Symposium Florizel. 87, Arlon.
- Grout BW and Donkin ME** (1987). Photosynthetic activity of cauliflower meristems cultures *in vitro* and at transplanting into soil. *Acta Hort.* **212**, 323-327.
- Grout BWW** (1988). Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro*, and the stresses of transplanting. *Acta Hort.* **230**, 129-135.
- Hagimori M, Matsumoto T, Mikami Y** (1984). Photoautotrophic culture of undifferentiated cells and shoot-growing cultures of *Digitalis purpurea* L. *Plant Cell Physiol.* **25**, 1099-1102.
- Hague DR, Sims TL** (1980). Evidence for light-stimulated synthesis of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves of maize. *Plant. Physiol.* **66**, 505-509.

- Hanson AD, Edelman J** (1972). Photosynthesis by carrot tissue culture. *Planta* **102**, 11-25.
- Hdider C, Desjardins Y** (1994). Changes in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and phosphoenolpyruvate carboxylase activities and  $^{14}\text{CO}_2$  fixation during the rooting of strawberry shoots *in vitro*. *Can. J. of Plant Sci.* **74**, 827-831.
- Hdider C, Desjardins Y** (1995). Reduction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase efficiency by the presence of sucrose during the tissue culture of strawberry plantlets. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* **31**, 165-170.
- Hew CS, Ting SK, Chia TK** (1988). Substrate utilization by *Dendrobium* tissue. *Bot. Gazette* **149**, 153-157.
- Hisajima S, Hasegawa T, Suzuki T** (1980). Partial purification and properties of sucrose-phosphate synthase from Morning-glory callus cels. *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **27** (3), 167-172.
- Hisajima S, Ito T** (1983). Activity and cellular distribution of disaccharidases in cultured cells of Japanese Morning-glory. *Agr. Biol. Chem.* **47** (1) 107-109.
- Hoagland DR, Arnon DI** (1950). The water culture method for growing plants without soil. *Current* **347**. Calif. Agr. Expt. Sta.
- Hwa-Kwa S, Wee YC, Kumar PP** (1997). Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase activities of photoautotrophic callus of *Platycerium coronarium* (Koenig ex O.F. Muell.) Desv. under  $\text{CO}_2$  enrichment. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **50**, 75-82.
- Hyndman SE, Hasegawa PN, Bressan RA** (1982). The role of sucrose and nitrogen in adventitious root formation on cultured rose shoots. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **1**, 229-238.
- Keys AJ, Major I, Parry MAJ** (1995). Is there another player in the game of Rubisco regulation? *J. Exp. Bot.* **46**, 1245-1251.
- Kirschbaum MUF, Percy RW** (1988). Gas exchange analysis of relative importance of stomatal and biochemical factors in photosynthetic induction in *Alocasia macrorrhiza*. *Plant Physiol.* **86**, 782-785.
- Kirschbaum MUF, Küpper M, Schneider H, Giersch C, Noe S** (1998). Modelling photosynthesis in fluctuating light with inclusion of stomatal conductance, biochemical activation and pools of key photosynthetic intermediates. *Planta* **204**, 16-26.
- Kovtun Y, Dale J** (1995). End-product control of carbon metabolism in culture-grown sugar beet plants. *Plant Physiol.* **108**, 1647-1656.
- Kozai T, Fujiwara K, Watanabe I** (1986). Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels. (2) Effects of stoppers and vessels on gas exchange rates between inside and outside of vessels with stoppers. *J. Agri. Met.* **42**, 119-127.

- Kozai T, Oki H, Fujiwara K** (1990). Photosynthetic characteristics of *Cymbidium* plantlet *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **22**, 205-211.
- Kozai T** (1991). Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: Debergh and R.H. Zimmerman (Eds), *Micropropagation Technology and application* (pp. 447-469). Kluwer Academic Publisher.
- Krapp A, Quick WP, Stitt M** (1991). Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase, other photosynthetic enzymes and chlorophyll decrease when glucose is supplied to mature spinach leaves via the transpiration stream. *Planta* **186**, 58-69.
- Kumar PP, Bender L, Thorpe TA** (1988). Activities of ribulose biphosphate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase and  $^{14}\text{C}$ -bicarbonate fixation during *in vitro* culture of *Pinus radiata* cotyledons. *Plant Physiol.* **87**, 675-679.
- Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227**, 680-685.
- Langford PJ, Wainright H** (1987). Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. *Ann. Bot.* **60**, 633-640.
- Lawlor DW** (1993). *Photosynthesis: molecular, physiological and environmental processes*. 2<sup>nd</sup> edn. Burnt Mill, Harlow; Longman Scientific and Technical.
- Lee N, Wetzstein Y, Sommer HE** (1985). Effect of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedling of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiol.* **78**, 637-641.
- Lees RP, Evans EH, Brown RG** (1990). A study of the chlorophyll fluorescence from mature and micropropagated *Clematis* by time resolved spectroscopy. *J. Photochem. Photobiol.*
- Lees RP, Evans EH, Nicholas JR** (1991). Photosynthesis in *Clematis*, 'The president', during growth *in vitro* and subsequent *in vitro* acclimatization. *J. Exp. Bot.* **238**, 605-610.
- Linsmaier EM, Skoog F** (1968). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* **18**, 100-127.
- Lipavská H, Vreugdenhil D** (1996). Uptake of mannitol from the media by *in vitro* grown plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **45**, 103-107.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-273.
- Maene LJ, Debergh PC** (1987). Optimization of transfer of tissue cultured shoots to *in vivo* conditions. *Acta Hort.* **212**, 335-348.
- Maretzka A, Thom M, Nickell L** (1974). Utilization and metabolism of carbohydrates in cell and callus cultures. In: Street HE (Eds). *Tissue Culture Plant Science* (pp. 330-361). Academic Press.

- Mezzetti B, Conte LS, Rosati P** (1991). *Actinidia deliciosa in vitro* II. Growth and exogenous carbohydrates utilization by explants. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* **26**, 153-160.
- Miziorko HM, Lorimer GH** (1983). Ribulose-1,5 biphosphate carboxylase-oxygenase. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 507-535.
- Murashige T, Skoog F** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays for tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* **15**, 473-497.
- Murashige T** (1974). Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25**, 135-166.
- Nakayama M, Kozai T, Watanabe I** (1991). Effects of sugar concentration in the medium and ventilation condition on the net photosynthetic rate of potato explants *in vitro*. *Proceedings of 11th Meeting of Plant Tissue Cult. Soc. Okayama Japan.* 186-187.
- Nato A, Mathieu Y** (1978). Changes in phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose carboxylase activities during the photoheterotrophic growth of *Nicotiana tabacum* (cv. xanthi) cell suspensions. *Plant sci. Lett.* **13**, 49-56.
- Neumann KH, Grob U, Bender L** (1989). Regulation of photosynthesis in *Daucus carota* and *Arachis hypogaea* cell cultures by exogenous sucrose. In: Kurz WGW (Eds) *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures II* (pp. 281-291). Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- Oka S, Ohyama K** (1986). Mulberry (*Morus alba* L.) In: Bajaj YPS (Ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Trees I* (pp. 384-392). Springer-Verlag, Berlin.
- Pasqua G, Dalla-Vecchia F, Rascio N, Casadoro G** (1989). Influence of exogenous sucrose on the greening of oat. *J. Ultrastruct. Mol. Struc. Res.* **102**, 249-254.
- Paul MJ, Stitt M** (1993). Effects of nitrogen and phosphorus deficiencies on levels of carbohydrates, respiratory enzymes and metabolites in seedlings of tobacco and their response to exogenous sucrose. *Plant Cell Environ.* **16**, 1047-1057.
- Peterson GL** (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346.
- Plums-Dhindsa PL, Dhindsa RS, Thorpe TA** (1979). Non autotrophic CO<sub>2</sub> fixation during shoot formation in tobacco callus. *J. Exp. Bot.* **30**, 759-767.
- Pollard JK, Shantz EM, Steward FC** (1961). Hexitols in coconut milk: their role in the nurture of dividing cell. *Plant Physiol.* **36**, 492-501.
- Portis ARJ** (1992). Regulation of Ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 415-437.
- Preece JE, Sutter EG** (1991). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh P, Zimmerman RH (Eds).

- Micropropagation: Technology and Application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 71-93.
- Radin JM, Parker LL, Sell CR** (1978). Partitioning of sugar between growth and nitrate reduction in cotton roots. *Plant Physiol.* **62**, 550-553.
- Rahman MA, Bake J** (1988). The effects of medium composition and culture conditions on in vitro rooting and ex vitro establishment of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **13**, 189-200.
- Rogers SMD, Ogren WL, Widholm JM** (1987). Photosynthetic characteristics of a photoautotrophic cell suspensions of soybean. *Plant Physiol.* **84**, 1451-1456.
- Romano A, Noronha C, Martins-Loucao MA** (1995). Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **40**, 159-167.
- Rugini E, Tarini P, Rossodivita ME** (1987). Control of shoot vitrification of almond and olive grown *in vitro*. *Acta Hort.* **212**, 177-183.
- Sahulka J, Lisa L** (1980). Effect of some disaccharides, hexoses and pentoses on nitrate reductase, glutamine and glutamate dehydrogenase in excised pea roots. *Physiol Plant* **50**, 32-36.
- Salisbury FB, Ross CW** (1978). *Plant Physiology*. Second Edition. Wadworth Publishing Company Inc.
- Schäfer C, Simper H, Hofmann B** (1992). Glucose feeding results in coordinated changes of chlorophyll content, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase activity and photosynthetic potential in photoautotrophic suspension cultured cells of *Chenopodium rubrum*. *Plant Cell Environ.* **15**, 343-350.
- Schneider H, Küppers M, Swan AG** (1991). Nettophotosynthese und Stomataverhalten der Blätter von Buchenkeimlingen (*Fagus sylvatica* L.) in Lichtflecken. *Verh Ges Ökol.* **20**, 967-972.
- Seemann JR, Kirschbaum MUF, Sharker TD, Pearcy RW** (1988). Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in *Alocasia macrorrhiza* in response to step changes in irradiance. *Plant Physiol* **88**, 148-152.
- Seemann JR, Berry JA, Freas SM, Krupp MA** (1985). Regulation of ribulose bisphosphate carboxylase activity *in vivo* by a light-modulated inhibitor of catalysis. *Proc. Natl Acad Sci USA.* **81**, 8024-8028.
- Serret MD, Trillas MI, Matas H, Araus JL** (1996). Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* **45**, 1-16.
- Sheen J** (1994). Feedback control of gene expression. *Photosynthesis Res.* **39**, 427-438.
- Smith, MAL, Palta JP, McCown BH** (1986). Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedling and greenhouse-grown Asian white birch. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **111**, 437-442.

- Solárová J** (1989). Photosynthesis of plant regenerants. Diurnal variation in CO<sub>2</sub> concentration in cultivation vessels resulting from plantlets photosynthetic activity. *Photosynthetica* **23**, 100-107.
- Street HE, Shillito RD** (1977). Nutrient media for plant organ, tissue and cell culture. In: Rechcigl M (Eds), *CRC Handbook in Nutrient and Food*. Vol. IV. (pp. 305-539), CRC Press. Inc., Boca Raton, Fla.
- Stret Y, Opik H, Strauss T** (1978). *Plant tissue and cell culture*, 2nd. Ed. Univ. Calif. Press. Berkeley.
- Tichá Y, Cap F, Pacovská D, Hofman P, Haisel D, Capková, Schäfer** (1998). Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. *Physiol. Plantarum* **102**, 155-162.
- Tremblay FM, Ladonde M** (1984). Requirements for *in vitro* propagation of seven nitrogen-fixing *Alnus* species. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **3**, 189-199.
- Van Oosten JJ, Wilkins D, Besford RT** (1994). Regulation of the expression of photosynthetic nuclear genes by CO<sub>2</sub> is mimicked by regulation by carbohydrates: a mechanism for the acclimation of photosynthesis to high CO<sub>2</sub>? *Plant Cell Environ.* **17**, 913-923.
- Wainwright H, Scrase J** (1989). Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcutting on *in vivo* establishments. *Sci. Hort.* **38**, 261-267.
- Wareing PF, Phillips IDJ** (1978). *The control of growth and differentiation in plants*, 2nd Ed. Pergamon Press. Oxford.
- Welander M, Welander NT, Brackman AS** (1989). Regulation of *in vitro* shoot multiplication in *Syringa*, *Alnus* and *Malus* by different carbon sources. *J. Hort. Sci.* **64** (3), 361-366.
- Wellburn AR** (1994). The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* **144**, 307-313.
- Widholm JM** (1992). Properties and uses of photoautotrophic plant cell cultures. In: Jeon KW, Friedlander M (Eds) *International Review of Cytology*, (pp 109-175). Academic Press Inc., London.
- Wright MS, Koehler SM, Hinchey MA, Carnes MG** (1986). Plant regeneration by organogenesis in *Glicine max*. *Plant Cell Rep.* **5**, 150-154.
- Woodrow IE, Berry JA** (1988). Enzymatic regulation of photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation in C<sub>3</sub> plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 533-594.
- Woodrow IE, Mott KA** (1989). Rate limitation of non-steady-state photosynthesis by ribulose-1,5-biphosphate carboxylase in spinach. *Aust. J. Plant Physiol.* **16**, 487-500.

## CAPITULO 3

### Discusión, conclusiones generales y perspectivas

#### a. Conclusiones generales

##### **Plantas de campo**

La actividad de la enzima encargada de fijar el  $\text{CO}_2$  atmosférico, Rubisco se mantiene elevada durante el día. Estos resultados corroboran los resultados anteriores observados por Keys *et al* (1995), determinando que la actividad Rubisco presente en los extractos de *Triticum aestivum* fue máxima durante el día y baja durante la noche. La otra enzima carboxilante, PEPc, se encontró en bajos niveles tanto de día como de noche. Esta es una de las principales característica de las plantas que presentan un metabolismo del carbono del tipo  $\text{C}_3$ .

Las plantas que fueron cultivadas en el campo presentaron una relación de actividades enzimáticas PEPc/Rubisco baja, lo que nos sugiere que su fijación de  $\text{CO}_2$  es autotrófica. El contenido de clorofila se mantuvo constante y dentro de los rangos reportados para las plantas  $\text{C}_3$  (Salisbury y Ross, 1978). Además se determinó que el contenido de proteínas totales se mantuvo constante durante el día y la noche.

La asimilación de  $\text{CO}_2$  determinado en estas plantas se presentó elevado durante las primeras horas del día, posteriormente descendió por la tarde. Durante la noche las plantas dejaron de fotosintetizar. Este comportamiento en la asimilación de  $\text{CO}_2$  es típico de una planta  $\text{C}_3$ .

Cabe señalar que en este caso se presentó un fenómeno en la asimilación de  $\text{CO}_2$  y la actividad de Rubisco que aún no nos resulta explicable.

Sin embargo, la caracterización de las plantas de campo resulto de suma importancia para compararla con las plantas que fueron cultivadas *in vitro*.

##### **Plantas cultivadas *in vitro***

#### **CRECIMIENTO**

El crecimiento y desarrollo de las plantas cultivadas *in vitro* se mantiene normalmente por el suplemento de los carbohidratos exógenos presentes en el medio de cultivo (Lipavská *et al.*, 1996).

Una disminución en la fuente de carbono (sacarosa) del 3% al 1.5% provocó un detrimento en el desarrollo y crecimiento de las vitroplantas de *T. erecta*. En consecuencia, una concentración elevada de la fuente de carbono exógena es un factor limitante para el crecimiento de estas plantas.

Un cambio de la fuente de carbono tradicionalmente utilizada (sacarosa) por los dos azúcares reductores que la forman, favorece el crecimiento y el desarrollo *in vitro* de las plántulas de *T. erecta*. Las plantas cultivadas *in vitro* en presencia de glucosa al 3%, mostraron un mayor incremento en la producción



de biomasa (peso fresco [PF] y seco[PS]). Este fenómeno probablemente se debe a la eficiencia en la entrada del carbohidrato, asociada con una elevada afinidad de los transportadores para glucosa (Tubbe y Buckhout, 1992). Además se demostró una mejor utilización de esta fuente de carbono en particular. En esta segunda fase en la que se reemplazó la fuente de carbono, podría descartarse un efecto osmótico sobre el crecimiento de las plantas, debido a que en ambos azúcares reductores, el potencial osmótico determinado fue muy similar, sin embargo con un resultado diferencial tanto en crecimiento como en desarrollo. Las plantas cultivadas en presencia de fructosa crecieron menos en comparación con las plantas cultivadas en presencia de glucosa. Esta diferencia radica primordialmente en la tasa de crecimiento, debido a que este es un indicio claro de la capacidad de metabolización de la planta por esta fuente de carbono. La fructosa por lo tanto, no estimuló la proliferación o crecimiento de las plantas. Quizás debido a la sensibilidad de la planta para degradar los productos formados como resultado del proceso de esterilización como furfural y el hidroximetilfurfural (Hisiao y Bornman, 1989; Uosukainen y Vasara, 1992; Druart y de Wulf, 1993).

Se puede concluir que el crecimiento de las plantas cultivadas *in vitro* está fuertemente influenciado por tres factores:

- a) La especie con la que se trabaja.
- b) El tipo de carbohidrato.
- c) La concentración del carbohidrato.

En general, la fuente de carbono utilizada mostró una marcada influencia sobre la formación de brotes, números de nudos separables por brotes así como su longitud en las vitroplantas de *T. erecta*.

Cabe señalar, que se intentó cultivar plantas sin ninguna fuente de carbono, sin embargo, fueron incapaces de crecer y en algunas ocasiones presentaron problemas morfológicos graves como: vitrificación e hiperhidricidad. Por lo tanto, la presencia de una mínima concentración de la fuente de carbono es importante como materia prima para los procesos de organogénesis *in vitro* y del metabolismo del carbono.

Sin embargo, aunque hay evidencias en las que la ausencia de una fuente de carbono favorece el crecimiento y desarrollo de la capacidad fotoautotrófica de plantas (Kozai *et al.*, 1988; Schäfer *et al.*, 1992; Hdider y Desjardins, 1995; Serret *et al.*, 1996), en esta especie en particular no sucedió así.

## MORFOGÉNESIS

Una reducción en la concentración de sacarosa del 3% al 1.5 % provocó una disminución en el desarrollo del área foliar, además del número de raíces, posiblemente se deba a una limitación en la fuente de carbono o energía, lo que probablemente provocó que las plantas presentarán una fuerte limitante en su desarrollo (Welandar *et al* 1989), el mejor desarrollo se obtuvo finalmente cuando las plantas fueron cultivadas con sacarosa 3%.

De las dos posibles alternativas en fuentes de carbono que se utilizaron (glucosa y fructosa) se determinó que las vitroplantas cultivadas en presencia de glucosa (al 3%) presentaron un mejor y mayor desarrollo del área foliar, el número de raíces fue similar al mostrado por las plantas cultivadas en presencia de sacarosa al 3%. En consecuencia estas plantas presentaron mejor vigor.

Las vitroplantas cultivadas en presencia de fructosa mostraron un bajo desarrollo del área foliar y en algunos casos se encontraron alteraciones morfológicas como vitrificación, además de un menor número de raíces. Este hecho parece estar asociado con bajas tasas en la entrada y metabolización del carbohidrato (Bender, 1987), como consecuencia de la incapacidad de esta especie por degradar los productos formados como resultado de la esterilización (Hsiao y Bornman, 1989; Uosukainen y Vasara, 1992; Druart y de Wolf, 1993)

Esta baja metabolización, pudiera ser provocada básicamente por dos factores que interactúan en conjunto:

1. Las células son poco eficientes en metabolizar fructosa.
2. Existe una baja afinidad de los transportadores de hexosas por fructosa (Tubbe y Buckhout, 1992).

## **CAPACIDAD FOTOAUTOTROFICA**

Las plantas cultivadas *in vitro* presentan una pobre capacidad fotosintética considerándose como un factor limitante para la eficiencia de la micropropagación.

Los factores responsables de esta respuesta en cultivo *in vitro*:

1. Baja intensidad de luz en los cuartos de crecimiento.
2. Elevada concentración de carbohidratos presentes en los medios de cultivo.

Bajo este contexto, algunos autores han sugerido que la reducción en la fotosíntesis de las plantas cultivadas *in vitro* puede deberse a una inhibición en la actividad y/o síntesis de Rubisco (Hagimori *et al.*, 1984; Grout y Donkin, 1987).

Esta enzima realiza la fijación de CO<sub>2</sub>, teniendo suma importancia su eficiencia en el uso de sus recursos: luz, nitrógeno y agua (Morell *et al.*, 1992).

La actividad de Rubisco es regulada por varios mecanismos que interactúan para controlarla por medio de una variedad de factores endógenos y del ambiente. Los factores intracelulares: incluyen varios metabolitos del estroma, pH, concentración de Mg<sup>+2</sup>, efectores fosforilados. La cantidad y la concentración de estos factores endógenos son controladas directamente o indirectamente por factores externos como luz o concentración de CO<sub>2</sub>.

Un exceso en la concentración de sacarosa presente en los medios de cultivo (3%) fue perjudicial para la actividad Rubisco, es decir, disminuyó en comparación con la actividad mostrada por las plantas cultivadas en presencia de sacarosa al 1.5%.

Estos resultados sugieren que el efecto negativo sobre la fotosíntesis de las plantas micropropagadas fue consecuencia de una disminución en la eficiencia de Rubisco.

Varios autores han demostrado que la presencia de sacarosa, resulta en un incremento en la concentración de hexosas citosólicas y una significativa disminución en el fósforo inorgánico en las hojas. Por lo tanto, la sacarosa parece inhibir directamente la síntesis de sacarosa, como consecuencia disminuye el reciclamiento de Pi en el cloroplasto y eventualmente una reducción en fotosíntesis. Se propone además que este incremento en los compuestos fosforilados parece desactivar Rubisco (Gierhs *et al.*, 1980; Portis, 1992).

Otras evidencias han mostrados que la presencia de sacarosa en los medios de cultivo induce una reducción en la actividad transcripcional de ciertos genes nucleares asociados a la fotosíntesis; por ejemplo, para la subunidad menor (Sheen, 1994; Van Oosten *et al.*, 1994) y la subunidad mayor de Rubisco (Neumann *et al.*, 1989; Groß *et al.*, 1993).

Cuando se reemplazó esta fuente de carbono por otros carbohidratos como glucosa y fructosa, la actividad de Rubisco aumento en ambos casos, casi igual a la actividad presentada por las plantas que fueron cultivadas en campo.

Se concluye que la inhibición en la actividad de Rubisco puede estar asociada a la presencia de sacarosa en el medio de cultivo.

Por lo tanto, en presencia de estos carbohidratos en el medio nutritivo parece ser un factor regulatorio sobre la fijación de CO<sub>2</sub> por Rubisco.

*T. erecta* como todas las plantas, contiene las dos enzimas de fijación de CO<sub>2</sub>, Rubisco y PEPc, sin embargo la contribución de la fijación del carbono por estas enzimas se encuentra regulada por la fase de crecimiento dentro del ciclo de cultivo, pH del medio (Herzbeck y Hüseman, 1985) y la calidad de luz (Hüseman *et al.*, 1989).

Sin embargo, la actividad de PEPc en las plantas cultivadas con alta concentraciones de sacarosa (3%) fue elevada en comparación con las plantas cultivadas con sacarosa 1.5%. Similares observaciones se han hecho durante el cultivo *in vitro* de *Pinus radiata* (Kumar *et al.*, 1988).

PEPc contribuye hasta cierto punto a la fijación de CO<sub>2</sub> en plantas micropropagadas. Es decir, el incremento en la actividad de PEPc puede responderse en cultivo *in vitro* por la presencia de carbohidratos en el medio de cultivo, como se ha sugerido para el cultivo, como se han sugerido para el cultivo de células, que requieren una demanda elevada en esqueletos carbonados para el anabolismo celular (Bender *et al.*, 1985).

Debido a que en cultivo *in vitro* parece tener una función completamente anaplórotica, encargada de suministrar esqueletos carbonados para el ciclo de Krebs (Turpin *et al.*, 1990), aminoácidos y síntesis de proteínas (Bender *et al.*, 1987; Kumar *et al.*, 1988; Melzer y O' Leary, 1987).

Como se ha reportado una característica de las plantas cultivadas *in vitro* es la actividad elevada de PEPc (Hdider y Desjardins, 1995).

Además se ha determinado que el nivel de actividad de PEPc fue totalmente dependiente de la concentración de los diferentes carbohidratos presentes en el medio de cultivo. Es decir, las plantas cultivadas en presencia

de sacarosa al 1.5%, la actividad de esta enzima fue baja en comparación con las plantas cultivadas con sacarosa al 3%, donde incremento.

En consecuencia, en el cultivo de tejidos la presencia de carbohidratos en concentraciones elevadas en el medio, promueven una actividad elevada de PEPc, siendo al parecer el segundo mecanismo importante en la carboxilación de las plántulas.

La relación PEPc/Rubisco de las plantas cultivadas en presencia de sacarosa en concentraciones bajas (1.5%), sugiere que su fijación de CO<sub>2</sub> fue fotoautotrófica. No sucedió así con las plantas cultivadas con concentraciones elevadas de sacarosa (3%) en donde la fijación mostrada fue no autotrófica. Similares resultados fueron encontrados en las plantas que fueron cultivadas con glucosa y fructosa. En consecuencia estas plantas presentaron un crecimiento hetero-mixotrófico.

Las plantas cultivadas en presencia de sacarosa al 1.5% mostraron niveles elevados en el contenido de proteínas totales.

Las plantas cultivadas en presencia de sacarosa en concentraciones elevadas exhibieron un mayor contenido en clorofila. La mayoría de la literatura reporta que la clorofila disminuye en respuesta a la presencia de sacarosa o sus productos de la hidrólisis (glucosa y fructosa), que al parecer suprimen la síntesis de los complejos de proteína de la clorofila (Sheen, 1994).

Sin embargo, algunos autores han sugerido que en presencia de sacarosa en concentraciones elevadas (2-6%), se induce la síntesis de clorofila (Pasqua *et al.*, 1984). Esto puede explicarse posiblemente ha una inducción en la actividad transcripcional de genes asociados con el complejo de clorofila a/b.

Contrario ha lo reportado por la mayoría de los autores, donde la sacarosa inhibe la síntesis de clorofila (Edelman y Hanson, 1971; Pamplin y Chapman, 1975).

A diferencia de lo reportado por otros autores, la clorofila bajo estas condiciones parece estar regulada por:

1. La presencia de carbohidratos, así como de su concentración.
2. La calidad e intensidad de luz.

Estos factores asociados inducen un cambio morfológico en estas plantas cultivadas *in vitro*. Es decir, se ha propuesto que las plantas bajo estas condiciones, no diferencian las membranas de los tilacoides de granas, además se encuentran arreglados en forma irregular (Lees *et al.*, 1985). Como consecuencia, las plantas *in vitro* pueden presentar una baja tasa fotosintética a intensidad de luz elevadas.

En general, los carbohidratos adicionados a los medios parecen ser los responsables por la inducción de este particular metabolismo del carbono desarrollado por las plantas micropropagadas.

## FOTOSÍNTESIS

Las plantas de *T. erecta* cultivadas en presencia de concentraciones elevadas de sacarosa exhibiendo tasas de respiración elevadas, durante la

noche. Como una característica particular de las plantas cultivadas bajo esta condición especial; *in vitro*, provocado, por la presencia de elevadas concentraciones de carbohidratos en el medio (Avelange *et al.*, 1990). Este autor ha propuesto que la presencia de los carbohidratos promueve un incremento en los productos glicolíticos (G<sub>6</sub>P, F<sub>6</sub>P) y por lo tanto se inducen estas tasas de respiración. El efecto de este suplemento sobre la actividad de enzimas respiratorias sugiere la estimulación en la tasa respiratoria, la cual se correlaciona con un incremento en su cantidad.

Es interesante destacar que la enzima Rubisco es el componente operativo determinante para el desarrollo óptimo del ciclo de Calvin (Servaites y Geiger, 1995).

Como enzima encargada de fijar CO<sub>2</sub>, es regulada por una gran gama de factores tanto endógenos como ambientales (Parry *et al.*, 1988; Seeman *et al.*, 1988; Robinson y Portis, 1989;). Siendo importantes en la modulación de su actividad. (Servaites y Geiger, 1995 y Viil y Pärnik, 1995).

Por lo tanto una limitante en alguno de estos factores provocaría que la enzima no se activará y en consecuencia la fotosíntesis se vería afectada, es decir disminuiría (Gray *et al.*, 1995).

Las plantas cultivadas en presencia de sacarosa al 1.5% mostraron bajas tasas de respiración durante el periodo de noche. En la intensidad de luz de los cuartos de cultivo (60-100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), estas plantas fueron capaces de presentar una fotosíntesis positiva. Además mostraron baja conductancia estomática.

La asimilación de CO<sub>2</sub> presentada por las plantas cultivadas con glucosa y fructosa fue elevada. Debido posiblemente a que en estas plantas la actividad de Rubisco fue elevada, por lo tanto se encuentran en mejores condiciones para responder a la transferencia a campo. Al parecer la sustitución de la fuente carbono (sacarosa por glucosa o fructosa) resulto benéfica para el desarrollo del aparato fotosintético reflejado como tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>. Estas plantas también presentaron elevadas tasas de conductancias estomáticas.

Cabe señalarse que en todos los casos mencionados, la cinética de actividad de Rubisco fueron similares al cambio fue similar al cambio en el censo temporal que se presentó en la conductancia estomática (Seeman *et al.*, 1988; Woodrow y Mott, 1989).

Se puede concluir, que en el caso específico de *T. erecta in vitro*, la fotosíntesis se encuentra limitada tanto por la intensidad como calidad de la luz de los cuartos de crecimiento donde son cultivadas las plantas. Siendo ampliamente comprobada por las respuestas obtenidas en las curvas-dosis a la intensidad de luz. Además parece también depender del tipo de fuente de carbono que se adiciona al medio de cultivo.

En general la actividad de Rubisco incrementa con la disminución en la concentración de carbohidratos presentes en el medio de cultivo. Se ha demostrado que bajo condiciones de elevada intensidad luz y baja concentración de sacarosa presente en el medio la actividad específica de Rubisco incremento (Hwa-Kwa, 1997).

Además se ha asociado que en las plantas de *T. erecta* cultivadas *in vitro* similar a lo reportado en el cultivo de tejidos, presentan un segundo mecanismo

de asimilación de CO<sub>2</sub>, a través de una elevada actividad de PEPc sugriendo una gran demanda de esqueletos carbonados para el crecimiento propuestos significativamente como contribución a la fotosíntesis neta (Nato y Mathieu, 1978; Kumar *et al.*, 1988).

Dentro de este contexto, algunos autores han sugerido que la reducción en la fotosíntesis de las plantas cultivadas *in vitro* se debe a una inhibición en la actividad y/o síntesis de Rubisco (Hagimori *et al.*, 1984; Grout y Donkin, 1987).

La importancia relativa de cada uno de los factores que participan en la tasa fotosintética depende en forma importante de las condiciones ambientales que prevalecen (Galtier *et al.*, 1995).

## b. PERSPECTIVAS.

La micropropagación tiene grandes ventajas sobre la propagación vegetativa convencional. Sin embargo, uno de los problemas más importantes que enfrenta en la actualidad la biotecnología en la producción de plantas *in vitro*, es la baja tasa de sobrevivencia de las plantas al ser transferidas a condiciones *ex vitro*. La presente tesis incluye un estudio básico sobre la fisiología y bioquímica de las plantas cultivadas *in vitro* y los posibles daños producidos por las condiciones microambientales, que repercuten al momento de la transferencia de la planta a condiciones *ex vitro*. De acuerdo a estos análisis se puede sugerir una serie de recomendaciones:

1. Una inducción hacia un metabolismo fotoautotrófico total de las plantas micropropagadas bajo condiciones *in vitro*.

A través de la manipulación de las diferentes condiciones que prevalecen durante el crecimiento y desarrollo de plántulas micropropagadas.

2. En el ámbito bioquímico y molecular faltaría aclarar a que nivel podría estar la alteración que provoca la presencia de sacarosa sobre la actividad de la enzima Rubisco.

Para promover la micropropagación fotoautotrófica, por lo tanto se induciría una capacidad fotosintética, reflejado en un incremento en las tasas de sobrevivencia *ex vitro* de las plántulas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Avelange MH, Sarrey F, Rébillé** (1990). Effects of glucosa feeding on respiration and photosynthesis in photoautotrophic *Dianthus caryophyllus* cell. *Physiol. Plant.* **94**, 1157-1162.
- Bender L, Kumar LA, Neumann KH** (1985). On the photosynthetic system and assimilate metabolism of *Daucus* and *Arachis* cell cultures. In: Neumann KH, Barz W, Reinhard E (Eds) *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*. Springer-Verlag, Berlin, 22-42.
- Bender L, Joy IV. RW, Thorpe TA** (1987) Studies von  $^{14}\text{C}$  glucose metabolism during shoot bud induction in cultured cotyledon explants of *Pinus radiata*. *Physiol. Plant.* **69**, 428-434.
- Druart P, de Wulf OC** (1993). Activited charcoal catalyses sucrose hydrolysis during autoclaving. *Plant. Cell Tissue Org. Cult.* **21**, 97-99.
- Edelman J, Hanson AD** (1971). Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot callus cultures. *Planta* **98**, 150-156.
- Galtier N, Foyer CH, Murchie E, Alred R, Quick P, Voelker TA, Thépenier C, Lascève G, Betsche T** (1995). Effects of light and atmospheric carbon dioxide enrichment on photosynthesis and carbon partitioning in the leaves of tomate (*Lypersicon esculentum* L.) plants over-expressing sucrose phosphate synthase. *J. Exp. Bot.* **46**, 1335-1344.
- Giersh C, Heber H, kaiser G** (1980). Intracellular metabolite gradients and flow of carbon during photosynthesis of leaf protoplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **205**, 246-259.
- Gray JC, Paul MJ, Barnes SA, Knight JS, Loynes A, Habash D, Parry MAJ, Lawlor DW** (1995). Manipulation of phosphoribulokinase and phosphate translocator activities in transgenic tobacco plants. *J. Exp. Bot.* **46**, 1309-1315.
- Groß U, Gilles F, Bender L, Berghöfer P, Neumann KH** (1993). The influence of sucrose and an elevated  $\text{CO}_2$  concentration on photosynthesis of photoautotrophic peanut (*Arachis hypogaea* L. ) cell cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **33**, 143-150.
- Grout BW and Donkin ME** (1987). Photosynthetic activity of cauliflower meristems cultures *in vitro* and at transplanting into soil. *Acta Hortic.* **212**, 323-327.
- Hagimori M, Matsumoto T, Mikami Y** (1984) Photoautotrophic culture of undifferentiated cells and shoot-growing cultures of *Digitalis purpurea* L. *Plant Cell Physiol.* **25**, 1099-1102.
- Hdider C, Desjardins Y** (1995). Reduction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase efficiency by the presence of sucrose during the tissue culture of strawberry plantlets. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* **31**, 165-170.
- Herzbeck H, Hüseman W** (1985). Photosynthetic carbon metabolism in photoautotrophic cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. In: Neumann KH, Barz W, Reihard E (Eds). *Primary and Secondary*



- Metabolism of Plant Cell Cultures. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 16-23.
- Hisiao KC, Bornman CH** (1989). Cyanide-initiated oxygen consumption in autoclaved culture medium containing sugars. *Plant Cell Rep.* **8**, 90-92.
- Hüsemann W, Fischer K, Mittelbach I, Hübner S, Richther G, Barz W** (1989). Photoautotrophic plant cell cultures for studies on primary and secondary metabolism In: Kurz WGW (Ed) Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures II. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg- New York, 35-41.
- Hwa-Kwa S, Wee YC, Kumar PP** (1997). Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase activities of photoautotrophic callus of *Platyserium coronarium* (Koenig ex O.F. Muell.) Desv. under CO<sub>2</sub> enrichment. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **50**, 75-82.
- Keys AJ, Major I, Parry MAJ** (1995). Is there another player in the game of Rubisco regulation? *J. Exp. Bot.* **46**, 1245-1251.
- Kozai T, Kubota C, Watanabe I** (1988). Effects of basal medium composition on the growth of carnation plantlets in auto- and mixotrophic tissue culture. *Acta Hort.* **230**, 159-166.
- Kumar PP, Bender L, Thorpe TA** (1988) Activities of ribulose biphosphate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase and <sup>14</sup>C-bicarbonate fixation during *in vitro* culture of *Pinus radiata* cotyledons. *Plant Physiol.* **87**, 675-679.
- Lipavská H, Vreugdenhil D** (1996). Uptake of mannitol from the media by *in vitro* grown plants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **45**, 103-107.
- Melzer E, O' Leary M** (1987). Anaplerotic CO<sub>2</sub> fixation by phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>3</sub> plants. *Plant Physiol.* **84**, 58-60.
- Nato A, Mathieu Y** (1978). Changes in phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose-biphosphate carboxylase activities during the photoheterotrophic growth of *Nicotiana tabacum* (cv. xanthi) cell suspensions. *Plant Sci. Lett.* **13**, 49-56.
- Neumann KH, Grob U, Bender L** (1989). Regulation of photosynthesis in *Daucus carota* and *Arachis hypogaea* cell cultures by exogenous sucrose. In: Kurz WGW (Eds) Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures II (pp. 281-291). Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- Pamplin EJ, Chapman JM** (1975). Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in tissue: Change in the activity of the enzyme of the chlorophyll biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.* **26**, 212-220.
- Parry MAJ, Keys AJ, Foyer CH, Furbank RT, Walker DA** (1988). Regulation of Ribulose 1,5-biphosphate carboxylase activity by the activase system in lysed spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* **87**, 558-561.
- Portis ARJ** (1992). Regulation of Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 415-437.
- Salisbury FB, Ross CW** (1978). *Plant Physiology* Second Edition. Wadworth Publishing Company Inc. 238, 11.
- Serret MD, Trillas MI, Matas H, Araus JL** (1996). Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* **45**, 1-16.



- Servaites JC, Geiger D** (1995). Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase by metabolites. *J. Exp. Bot.* **46**, 1277-1283.
- Schäfer C, Simper H, Hofmann B** (1992). Glucose feeding results in coordinated changes of chlorophyll content, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase activity and photosynthetic potential in photoautotrophic suspension cultured cells of *Chenopodium rubrum*. *Plant Cell Environ.* **15**, 343-350.
- Sheen J** (1994). Feedback control of gene expression. *Photosynthesis Res.* **39**, 427-438.
- Tubbe A, Buckhout TJ** (1992). In vitro analysis of the H<sup>+</sup> hexose symporter on the plasma membrane of sugar-beets (*Beta vulgaris* L.) *Plant. Physiol.* **99**, 945-951.
- Turpin DH, Botha FC, Smith RG, Fiel R, Horsey AK, Vanlerberghe GC** (1990). Regulation of carbon partitioning to respiration during dark ammonium assimilation by the green alga *Slenastrum minutum*. *Plant Physiol.* **93**, 166-175.
- Uosukainen M, Vasara T** (1992). Effects of autoclaving on micropropagation medium. In: COST 87 Session, Dijon, France 1992.
- Van Oosten JJ, Wilkins D, Besford RT** (1994). Regulation of the expression of photosynthetic nuclear genes by CO<sub>2</sub> is mimicked by regulation by carbohydrates: a mechanism for the acclimation of photosynthesis to high CO<sub>2</sub> ? *Plant Cell Environ.* **17**, 913-923.
- Viil J, Pärnik T** (1995). The rate constant for the reaction of CO<sub>2</sub> with enzyme-bound ribulose1,5-bisphosphate *in vivo*. *J. Exp. Bot.* **46**, 1301-1307.
- Welander M, Welander NT, Brackman AS** (1989). Regulation of *in vitro* shoot multiplication in *Syringa*, *Alnus* and *Malus* by different carbon sources. *J. Hort. Sci.* **64** (3), 361-366.
- Woodow IE, Mott KA** (1989). Rate limitation of non-steady-state photosynthesis by ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in spinach. *Aust. J. Plant. Physiol.* **16**, 487-500.





Foto 1. Observación del crecimiento y desarrollo en plantas de *Tagetes erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa al 3 y 1.5%, después de ser cultivadas durante 21 días.



Foto 2. Observación del crecimiento y desarrollo de hojas en plantas de *Tagetes erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa al 3 (A) y 1.5% (B), después de ser cultivadas durante 21 días.



Foto 3. Observación del crecimiento de raíces en plantas de *Tagetes erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa al 3 (A) y 1.5% (B), después de ser cultivadas durante 21 días.





Foto 4. Observación del crecimiento de plantas de *Tagetes erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa al 3%, glucosa al 3% y fructosa al 3% (C) después de ser cultivadas durante 21 días.

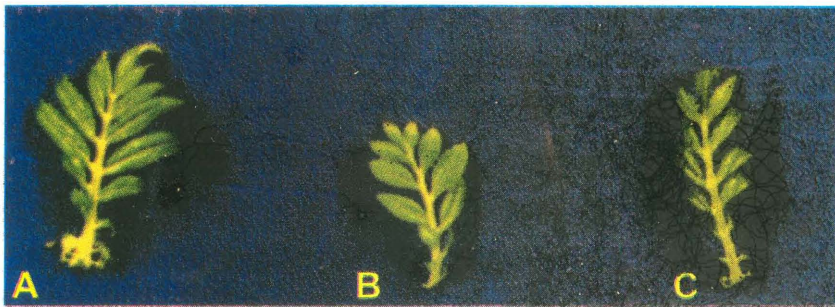


Foto 5. Observación del crecimiento y desarrollo en plantas de *Tagetes erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa al 3%, glucosa al 3% y fructosa al 3% (C) después de ser cultivadas durante 21 días.

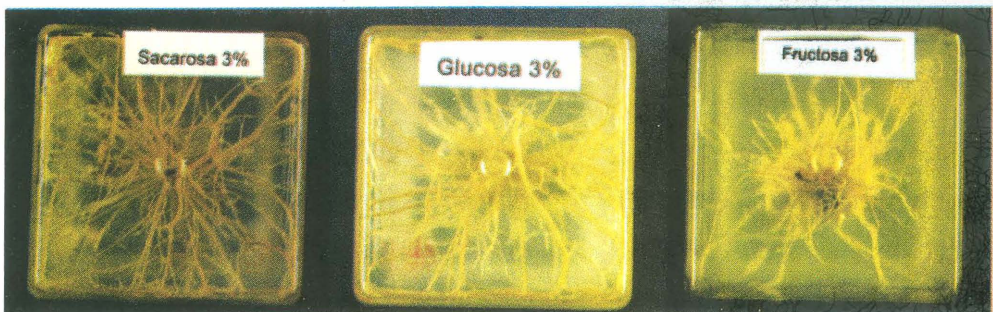


Foto 6. Observación del crecimiento de raíces en plantas de *Tagetes erecta* micropropagadas en presencia de sacarosa al 3%, glucosa al 3% y fructosa al 3% (C) después de ser cultivadas durante 21 días.