



COECYTJAL
Consejo Estatal de Ciencia
y Tecnología de Jalisco

TÓPICOS DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA

Topics of Biotechnological Tools for Agricultural Development



Tópicos de Herramientas Biotecnológicas para el Desarrollo Agrícola

Topics of Biotechnological Tools for Agricultural Development

EDITOR

José Juvencio Castañeda Nava

AUTORES

Janet María León Morales

Soledad García-Morales

Antonia Gutiérrez Mora

José Juvencio Castañeda-Nava

Prasad Rout Nutan

José Manuel Rodríguez Domínguez

Julio A. Massange Sánchez

Rodrigo Barba González

Jhony Navat Enriquez Vara

Gabriel Rincón Enríquez



AGRADECIMIENTOS

El libro “Tópicos de Herramientas Biotecnológicas para el Desarrollo Agrícola” fue apoyado por el programa 2020 Programa de Difusión y Divulgación de la Ciencia, Tecnología e Innovación (DyD) del Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Jalisco (COECYTJAL).

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Laboratorio Nacional PlanTECC por el apoyo económico otorgado en el proyecto “Mantenimiento de la infraestructura del Laboratorio Nacional PlanTECC” con número 315918 en el año 2021.

“Tópicos de Herramientas Biotecnológicas para el Desarrollo Agrícola”

© Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.

Av. Normalistas # 800

Col. Colinas de la Normal

C.P. 44270

Guadalajara, Jalisco, México.

www.ciatej.mx

Año de edición 2021

Primera edición impresa 2021

Número Internacional Normalizado del Libro impreso (ISBN): 978-607-8734-32-0

Número Internacional Normalizado del Libro digital (ISBN): 978-607-8734-35-1

Fotografía de la Portada: José Juvencio Castañeda-Nava

Diseño de portada: Karen Elizabeth Pérez Beltrán

Prologo

Existen diversos documentos físicos y sitios digitales que dan a conocer el crecimiento de la población mundial, por ejemplo: “Worldometer”. Esta información, aunque podría no ser exacta, si da una idea del crecimiento de la población en el mundo y por lo tanto lleva inmediatamente a una pregunta absolutamente inquietante: ¿hay o habrá alimento suficiente para los humanos en el futuro? Por otra parte, los continuos éxitos en la medicina permiten que la esperanza de vida del ser humano se extienda por mas años. Según información del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), la esperanza de vida en México en el año 1930 era de 34 años, la cual subió a 75 años en el año 2019. De esta manera, es lógico pensar que para el presente año la esperanza de vida podría ser de cuando menos 75 años o mas. Además de la situación demográfica ya mencionada, existen otros grandes problemas resultantes del cambio climático global que resultan grandes obstáculos para la producción de alimentos.

Los hechos mencionados anteriormente representan grandes retos para los científicos e innovadores de todo el mundo dedicados a la actividad agropecuaria para lograr una producción sostenible de alimentos para la población presente y futura de todo el mundo.

En la presente obra, investigadores del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) y de otras destacadas instituciones mexicanas, presentan análisis de problemáticas y sus posibles soluciones con recientes reportes de investigación, principalmente orientados a la actividad agrícola.

El Capítulo 1 da a conocer los principios básicos de los metabolitos secundarios producidos por las plantas y como la producción de estos se puede incrementar *in vivo* e *in vitro* para diversos usos alimenticios y medicinales entre otros. Esta sección del libro trata especialmente de la búsqueda y uso de elicitors bióticos y abióticos que pueden facilitar el incremento en el rendimiento de estas importantes moléculas producidas por las plantas.

El uso de bioestimulantes en la gricultura es de una importancia alta para incrementar el rendimiento y la calidad de granos y forrajes. El Capítulo 2 presenta el panorama actual del uso de aminoácidos, sustancias húmicas y microorganismos benéficos como “bioestimulantes”. La importancia de estos elementos, radica en eliminar al máximo el uso de productos químicos, principalmente para la fertilización de los cultivos, los cuales han afectado negativamente las propiedades de los suelos, y en general el medio ambiente.

El Capítulo 3 presenta un interesante tema biotecnológico para la producción *in vitro* de semillas sintéticas. Este sistema de producción es utilizado principalmente para la micropropagación de especies de alto interés económico y que además presentan problemas de producción de semillas y de propagación vegetativa natural. La producción de semillas sintéticas está basada en la producción de embriones somáticos *in vitro* y su posterior protección con elementos sintéticos que simulan al endospermo natural de una semilla.

Continuando con el tema de la propagación masiva *in vitro* de plantas, el Capítulo 4 muestra amplia información de un novedoso sistema de micropropagación sin el uso de elementos sólidos o semisólidos que sostengan al cultivo. Este, consiste en una serie de pasos en los cuales el cultivo *in vitro* está de forma no continua temporal y espaciada en contacto con el medio de cultivo, el cual incluye los nutrientes y reguladores de crecimiento necesarios para su propagación y desarrollo.

El Capítulo 5 aborda un tema relacionado con el mejoramiento genético de especies vegetales. La variación genética es la base fundamental del mejoramiento de los cultivos. Los sistemas de producción de mutantes y la posterior selección de las variantes de interés para la agricultura han dado como resultado la producción de un número grande de variedades agrícolas desde hace muchas décadas. Esta sección muestra nuevas técnicas para la aplicación de mutágenos y nuevos y eficientes sistemas de selección de individuos mutantes, sean estos células o individuos completos.

Por otra parte, aunque el tópico que trata el Capítulo 6 no está relacionado con alimentos, si está relacionado con una actividad agrícola altamente productiva en México: la floricultura. En esta sección del libro se analizan y se dan a conocer procesos alternativos para la conservación de flores en estado seco. En múltiples ocasiones, la sobreproducción en

algunas zonas del país produce considerables pérdidas económicas. Los diversos procesos de secado permiten comercializar flores no frescas en cualquier época del año.

El capítulo 7 permitirá al lector conocer los diversos usos del conocimiento y aplicación de la biología molecular de plantas. Estos conocimientos permiten hacer uso de marcadores moleculares para la obtención de patentes y registro de variedades y para la selección de individuos sobresalientes en programas de mejoramiento genético entre otras muchas aplicaciones.

Otro aspecto importante del conocimiento aplicado al mejoramiento genético de los cultivos es el campo de la citogenética. La citogenética es el estudio de los cromosomas y su manipulación con técnicas que pueden ser trabajadas *in vitro* o *ex vitro*. Tal es el caso de los procesos de poliploidización de plantas ornamentales de alto valor económico, las cuales se mencionan en el Capítulo 8.

Los Capítulos 9 y 10 tratan temas de control de plagas y enfermedades de los cultivos. En estas secciones se muestran métodos y resultados de investigación para combatir plagas y enfermedades con métodos amigables con el medio ambiente, tal es el caso del uso de bacterias y hongos entomopatógenos que destruyen plagas de insectos, y son inocuas para las plantas. Por otra parte, se muestra el uso de bacteriófagos (virus que infectan y matan bacterias) para combatir enfermedades bacterianas en los cultivos y aún en alimentos procesados con el fin de alargar su vida de anaquel, principalmente embutidos.

Finalmente es el deseo de los autores que esta compilación de conocimiento contenida en esta obra, sea de utilidad para estudiantes, profesionistas y público en general ligado a la agricultura de nuestro país y de otras latitudes a donde pueda llegar este esfuerzo.

Benjamín Rodríguez Garay Julio 2021

Contenido Contents

Capítulo I	
Uso de elicitores para incrementar la producción de metabolitos bioactivos en plantas.....	1
Use of elicitors to increase bioactive metabolites production in plants	
Capítulo II	
Panorama actual de los bioestimulantes agrícolas.....	14
Current overview of agricultural biostimulants	
Capítulo III	
Semillas sintéticas producidas en laboratorio.....	22
Synthetic seeds produced in a laboratory	
Capítulo IV	
Los sistemas de inmersión temporal una alternativa para la micropropagación.....	28
Temporal immersion systems an alternative for micropropagation	
Capítulo V	
Generación de nuevas variedades de plantas mediante mejoramiento genético por mutaciones.....	36
Generation of new plant varieties by genetic improvement through mutation	
Capítulo VI	
Técnicas de secado de flores para prolongar la vida de florero.....	47
Flower drying techniques to extend vase life	
Capítulo VII	
Técnicas avanzadas de biología molecular y su aplicación en los cultivos.....	56
Advanced molecular biology techniques and their application in crops	
Capítulo VIII	
Herramientas biotecnológicas para el mejoramiento genético de plantas ornamentales, con énfasis en la poliploidización.....	63
Biotechnological tools for genetic improvement of ornamental plants with empahsis on polyploidization	
Capítulo IX	
Control biológico de plagas con microorganismos entomopatógenos.....	73
Biological control of insect pest by entomopathogenic microorganisms	
Capítulo X	
Biocontrol de bacterias fitopatógenas y deterioradoras de alimentos mediante fagoterapia.....	81
Biocontrol of phytopathogens and food deteriorating bacteria by phagetherapy	

Capítulo I

Uso de Elicitores para Incrementar la Producción de Metabolitos Bioactivos en Plantas

Use of Elicitors to Increase Bioactive Metabolites Production in Plants

Janet María León Morales^{1a}, Soledad García-Morales^{1*}

¹CONACYT-Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México, CP 45019. ^ajmlm21@outlook.es, *Autor correspondencia: smorales@ciatej.mx

Introducción

Los metabolitos secundarios con alguna actividad biológica, también denominados compuestos bioactivos, carecen de una función vital en el desarrollo y en los procesos fundamentales de las plantas, pero desempeñan un papel importante en su interacción con el entorno, actuando como sustancias químicas de defensa contra insectos, herbívoros y fitopatógenos; así como para la adaptación de las plantas bajo condiciones de estrés ambiental. Las plantas sintetizan una amplia gama de fitoquímicos como alcaloides, flavonoides, quinonas, lignanos, esteroides y terpenoides que se utilizan como productos farmacéuticos, agroquímicos, aromas, fragancias, colorantes, biopesticidas o aditivos alimentarios. Además, muchos fármacos empleados con éxito se derivan directa o indirectamente de plantas. Sin embargo, la producción de metabolitos secundarios es menor del 1% (con base en el peso seco), este contenido depende principalmente del estado fisiológico y del desarrollo de la planta [1].

Existen varias estrategias biotecnológicas para aumentar la producción de metabolitos secundarios, entre ellas, la elicitación es una de las herramientas más factibles, eficaces y ampliamente utilizadas en la práctica para la inducción de nuevos compuestos bioactivos o para mejorar la biosíntesis y acumulación de fitoquímicos *in planta* o en cultivos *in vitro* de células, tejidos, órganos y plantas completas [2]. Bajo estas condiciones, las plantas o las células vegetales muestran una respuesta fisiológica y morfológica a factores bióticos o abióticos que se conocen como elicitores. Un elicitor se puede definir como una sustancia que, cuando se aplica en bajas cantidades a un sistema vivo, induce o mejora la biosíntesis de un compuesto específico que desempeña un papel importante en las adaptaciones de las plantas a las condiciones de estrés [1]. Por lo tanto, la elicitación es la biosíntesis inducida o mejorada de metabolitos secundarios debido a la aplicación de cantidades mínimas de elicitores, lo que conlleva a una mayor acumulación de compuestos bioactivos o a la inducción de nuevos metabolitos secundarios. Este proceso

Introduction

Secondary metabolites with any biological activity, also called bioactive compounds, have no vital function in development and fundamental plant processes. However, they perform an important role in their interaction with the environment, acting as chemical defense substances against insects, herbivores and phytopathogens, as well as for adaptation of plants to environmental stress conditions. Plants synthesize a wide array of phytochemicals, such as alkaloids, flavonoids, quinones, lignans, steroids, and terpenoids that are used as pharmaceuticals, agrochemicals, fragrances, dyes, biopesticides or food additive. Additionally, many drugs used successfully are derived directly or indirectly from plants. Nonetheless, secondary metabolites production is lower than 1% (based on dry weight); this content depends mainly on physiological state and development of the plant [1].

Several biotechnological strategies increase secondary metabolites production, and the elicitation is one of the most feasible and widely used tools in practice for inducing new bioactive compounds or improving biosynthesis and phytochemicals accumulation *in planta* or *in vitro* cultures of cells, tissues, organs, and whole plants². Under these conditions, plant cells show a physiological and morphologic response to biotic or abiotic factors known as elicitors. An elicitor is defined as a substance that, when applied in low quantities to live systems, induces or improves biosynthesis of a specific compound that plays a very important role in plant adaptation to stress conditions[1]. Thus, elicitation is the induced or improved biosynthesis of secondary metabolites due to the application of minimum quantities of elicitors, results in higher accumulation of bioactive compounds or induction of new secondary metabolites. This process of

de aumentar la síntesis de metabolitos secundarios en las plantas asegura su supervivencia en condiciones adversas.

Los elicitores se pueden clasificar de acuerdo con su naturaleza (como abióticos o bióticos) o en base a su origen (como exógenos y endógenos). Los elicitores abióticos incluyen factores de estrés químicos y físicos, como la luz y la radiación UV; iones (Ag, Cd, Cu, V, Ni, Se); cambios de temperatura; estrés osmótico (sequía, salinidad), moléculas de señalización intracelular como el ácido jasmónico (JA), el metiljasmonato (MeJA), el ácido salicílico (SA), el ácido acetil salicílico (ASA) y la sistemina. Mientras que, los elicitores bióticos son extractos crudos o productos parcialmente purificados derivados de microorganismos patógenos o endófitos (hongos, bacterias, levaduras) o de la propia planta. Los elicitores bióticos tienen una composición definida, como los polisacáridos, las glicoproteínas, las enzimas inactivadas, el quitosano purificado, la pectina, la quitina, el alginato, el xantano o una composición compleja, como el extracto de levadura y el homogeneizado fúngico. Los elicitores exógenos son sustancias químicas procedentes del patógeno microbiano o de la planta, como péptidos, polisacáridos, poliaminas, ácidos grasos y glicoproteínas; mientras que los elicitores endógenos son sustancias químicas dentro de la célula, que desempeñan un papel importante en el sistema de transducción de señales intracelulares, incluye los oligosacáridos pécticos liberados de la pared celular de la planta y los compuestos de señalización intracelular como SA, MeJA, JA y sistemina [2].

Los elicitores actúan como una señal y la elicitación comienza con la percepción de esta señal por los receptores específicos que se localizan en la membrana celular de la planta, después inicia la cascada de transducción de señales y, como consecuencia, cambia el nivel de expresión de varios genes que codifican factores de transcripción y genes que regulan las rutas metabólicas de los metabolitos secundarios, resultando en una mayor síntesis y acumulación de fitoquímicos [2].

Producción de metabolitos bioactivos en cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos, así como la micropropagación de plantas completas son algunas de las estrategias biotecnológicas más utilizadas para la producción y aprovechamiento de metabolitos secundarios con actividades biológicas de interés para el ser humano. Dentro de las ventajas que ofrecen estos sistemas de cultivo comparado con las plantas silvestres, son el aporte

increasing secondary metabolites synthesis in plants ensures their survival in adverse conditions.

Elicitors may be classified according to their nature (abiotic or biotic) or based on their origin (exogenous and endogenous). Abiotic elicitors include chemical and physical stress factors, such as ultraviolet (UV) light radiation; ions (Ag, Cd, Cu, V, Ni, Se); temperature extremes; osmotic stress (drought, salinity); as well as, intracellular signaling molecules, such as jasmonic acid (JA), methyl jasmonate (MeJA), salicylic acid (SA), acetylsalicylic acid (ASA) and systemin. Whereas biotic elicitors are raw extracts or partially purified products derived from pathogenic or endophytic microorganisms (fungi, bacteria, yeasts) or the same plant. Biotic elicitors have a defined composition, such as polysaccharides, glycoproteins, inactivated enzymes, purified chitosan, pectin, chitin, alginate, xanthan or a complex composition, as yeast extract and fungal homogenate. Exogenous elicitors are chemical substances derived from pathogenic microorganism or the plant, such as peptides, polysaccharides, polyamines, fatty acids, and glycoproteins. On the other hand, endogenous elicitors are chemical substances within the cell that perform an important role in the intracellular signal transduction system, which include pectic oligosaccharides released from the cellular wall of the plant and intracellular signaling compounds, such as SA, MeJA, JA, and systemin [2].

Elicitors act as a signal, and elicitation begins with the perception of this signal by specific receptors located in the plant cellular membrane. After that, the cascade of signal transduction starts, and as consequence, change the expression of several genes that encode transcription factors and biosynthetic enzymes of secondary metabolites, resulting in enhanced synthesis and accumulation of phytochemicals [2].

Bioactive metabolites production in plant *in vitro* culture

In *vitro* culture of cells, tissues, and organs, as well as whole plant micropropagation are some of the biotechnological strategies widely used for production and exploitation of secondary metabolites with biological activities of interest for humans. The major

constante de material vegetal independientemente de la etapa fenológica, época del año y condiciones ambientales, además que los cultivos crecen bajo condiciones controladas y libre de patógenos los cuales pueden tener una influencia en la producción de los compuestos. Sin embargo, la baja productividad que presentan algunos cultivos ha impulsado la aplicación de estrategias complementarias para incrementar la producción de metabolitos secundarios, tales como la optimización de los medios de cultivo, la selección de líneas altamente productivas, la inmovilización de las células vegetales, la biotransformación y la elicitación [3].

Dentro de los elicitores bióticos más utilizados para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de tejidos vegetales se encuentran el extracto de levadura, el quitosano y la pectina (Cuadro 1). La producción de quinonas norditerpenoides en el cultivo de raíces adventicias de *Perovskia abrotanoides* Kar. incrementó después de 7 d de tratamiento con 100 y 200 μ M de extracto de levadura, siendo más marcado el efecto en el contenido de criptotanshinona [4]. También han sido utilizados para elicitar la producción de diferentes clases de metabolitos secundarios en cultivos de células en suspensión. Por ejemplo, la acumulación de euricomano (quasinoide) en las células en suspensión de *Eurycoma longifolia* Jack incrementó después de 14 d de exposición a las concentraciones más altas evaluadas (150, 200 y 250 mg/L) de extracto de levadura [5]. Este elicitador también ha sido eficiente en inducir la producción del partenólido en cultivos en suspensión de *Tanacetum parthenium* L. a una concentración baja (2.5 mg/L) y en un período de exposición más corto (1-3 d) [6]. En contraste, en el cultivo en suspensión de *Phoenix dactylifera* L. se observó una reducción en el contenido de catequina, ácido cafeico y kaempferol con la aplicación de extracto de levadura y pectina, observándose también con este último elicitador un impacto negativo en el contenido de flavonoides y fenólicos totales [7]. En cuanto a la producción de curcubitacinas E, I (CuE y Cul), los cultivos de callos obtenidos a partir de explantes de hoja y raíces de *Ecballium elaterium* L. tuvieron una respuesta mayor al quitosano comparado con las líneas derivadas de explantes de tallos después de 48 h de exposición [8].

advantages of these culture systems, as compared to wild plants, include the constant supply of plant material independently from the phenological stage, season of the year, and environmental conditions. Additionally, *in vitro* cultures grow under controlled and pathogen-free conditions, which may have an influence in compound production. However, the low yield of phytochemicals in some plant cultures has prompted the application of additional strategies to increase the secondary metabolites production, such as culture media optimization, selection of highly productive cell lines, plant cell immobilization, biotransformation, and elicitation [3].

The yeast extract, chitosan and pectin are the biotic elicitors most used to increase the secondary metabolite production in the *in vitro* plant tissue culture (Table 1). The production of norditerpenoid quinones in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Kar. increased after seven days of treatment with 100 and 200 μ M of yeast extract, with an effect more pronounced in cryptotanshinone content [4]. They have also been used to elicit production of different classes of secondary metabolites in cell suspension cultures. For example, eurycomanone (quassinoid) accumulation in cell suspension of *Eurycoma longifolia* Jack increased after 14 days of exposure to the highest yeast extract concentrations (150, 200 and 250 mg/L) assessed [5]. This elicitor has also been efficient in parthenolide production in cell suspension cultures of *Tanacetum parthenium* L. at a low concentration (2.5 mg/L) and a shorter period of exposure (1-3 days) [6]. In contrast, in cell suspension culture of *Phoenix dactylifera* L. a reduction in catechin, caffeic acid, and kaempferol content was observed with the application of yeast extract and pectin. Also, a negative impact was observed in total flavonoid and phenolic contents with the latter elicitor [7]. As to the production of curcubitacin E, I (CuE and Cul), the callus culture obtained from leaf and root explants of *Ecballium elaterium* L. had a greater response to chitosan compared with the lines obtained from stem explants after 48 h of exposure [8].

Cuadro 1. Uso de elicitores para la acumulación de compuestos bioactivos en tejidos vegetales bajo condiciones de cultivo *in vitro* o in-planta en sistemas de producción agrícola.

Table 1. Use of elicitors for bioactive compound accumulation in plant tissues under *in vitro* cultures conditions or in-plant in agricultural production systems.

Elicitor	Especie vegetal	Tipo cultivo	Acumulación de metabolitos	de	Intervalo de concentración	Referencia
<i>In vitro</i>						
1) Manitol	Pepino amargo (<i>Ecballium elaterium</i> L.)	Callos	Curcubitacinas (I y E)	de	1) 1, 2 y 3%	8
2) Ácido salicílico					2) 0.5, 10 y 20 mM	
3) Quitosano					3) 10, 100 y 1000 mg/L	
4) Ácido acético					4 y 5) 0.16, 1.6 y 16 mM	
5) Ácido cítrico						
1) Ácido salicílico	Neem (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.)	Células en suspensión	Azadiractina	de	1) 0.25, 0.5 y 0.75 mM	13
2) Ácido jasmónico					2) 0.05, 0.25 y 0.5 mM	
3) NaCl					3) 50, 75 y 100 mM	
Pectina, extracto de levadura, ácido salicílico, CdCl ₂ , AgNO ₃	Palma (<i>Phoenix dactylifera</i> L.)	Células en suspensión	Fenólicos y flavonoides totales.		50, 100 y 200 mg/L	7
			Catequina, ácido cafeico, kaempferol y apigenina.			
1) Extracto de levadura	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	Células en suspensión	Euricomano	de	1) 20-250 mg/L	5
2) Metiljasmonato					2 y 3) 10-500 µM	
3) Ácido salicílico						
1) Extracto de levadura	Matricaria (<i>Tanacetum parthenium</i> L.)	Células en suspensión	Partenólido	de	1) 2.5 mg/L	6
2) Metiljasmonato					2y 3) 0.5 mg/L	
3) AgNO ₃						
Extracto celular:filtrado de <i>Camarosporomyces flavigenus</i>	Avellano común (<i>Corylus avellana</i> L.)	Células en suspensión	Paclitaxel		2.5, 5 y 10%	10
Ácido salicílico	Campanilla (<i>Eschscholzia</i>)	Células en suspensión	Sanguinarina macarpina	y	4, 6 y 8 mg/L	12

	<i>californica</i> Cham.)					
1) Metiljasmonato	Hierba de San Juan (<i>Hypericum perforatum</i> L.)	Células en suspensión	Flavonoides totales	1) 50-200 µM	14	
2) Ácido salicílico				2) 100 µM		
3) NH ₄ VO ₃				3) 50 µM		
4) NiSO ₄				4) 15 µM		
Coronatina	Lenteja de agua (<i>Lemna paucicostata</i> Hegelm.)	Plántulas	Ácidos fenólicos: cafeico, m- and p-cumárico, isoferúlico y sinápico.	1 µM	9	
1) Ácido salicílico	Cedrón (<i>Hyptis pectinata</i> L.)	Plántulas	Ácido rosmarínico	30 y 60 µM	11	
2) AgNO ₃						
1) AgNO ₃	<i>Perovskia abrotanoides</i> Kar.	Raíces adventicias	Criptotanshinona y tanshinona IIA	1 y 2) 5, 25 y 50 µM	4	
2) Sorbitol				3) 50, 100 y 200 µM		
3) Extracto de levadura				4) 10, 50 y 100 µM		
4) Metiljasmonato						
AgNO ₃ y AgNPs	Pepino silvestre (<i>Cucumis anguria</i> L.)	Raíces transformadas	Ácidos hidroxibenzoicos, hidroxicinámicos, flavonoides.	0.5, 1 y 2 mg/L	15	

In-planta

1) Ácido araquidónico	Lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.)	Sustrato	Kaempferol, quercetina, luteolina, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido o- y p-cumárico.	1 y 2) 1, 100 µM	16
2) Ácido jasmónico				3) 50, 100 µM	
3) Ácido abscísico					
Melatonina	Cereza dulce (<i>Prunus avium</i> L.)	Suelo	Fenólicos totales, antocianinas totales, flavanoles totales	50, 100 y 200 µM	22
Na ₂ SeO ₃	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Germinados	Genisteína malonilada, glucósidos de daidzeína malonilada	32 mg/L	27
<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>asperellum</i>	<i>T.</i> Chile (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Mezcla de suelo	de Ácidos shikímico, gálico, clorogénico, siríngico y ferúlico, daidzeína, kaempferol	2×10 ⁷ /mL	24

1) Quitosano	Alubias (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Germinados	Fenólicos solubles	1) 50 mg/L 2) 5 mM	26
Metiljasmonato	Pak choi (<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>Chinensis</i>)	Sustrato comercial	Neoglucobrasicina, progoitrina, glucobrassicinapina	500 µM	17
Metiljasmonato	Brócoli (<i>Brassica oleracea</i> L.)	Sustrato comercial	Neoglucobrasicina	250 µM	19
Metiljasmonato	Granada (<i>Punica granatum</i> L.)	Suelo	Fenólicos totales, antocianinas totales, antocianinas individuales	1, 5, 10 mM	20
Déficit hídrico	Granada (<i>Punica granatum</i> L.)	Suelo	Delfinidina-3,5-diglc, delfinidina-3-glc, galoilhex, casuarinina, ácido elágico	100, 75, 50, 25% régimen de riego	21
Déficit hídrico	Lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.)	Suelo	Ácidos chicórico, clorogénico, cafeico y catártico, kaempferol, quercetina y miricetina	25, 50, 75% déficit de riego	22
Cromo	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	Suelo	Vincristina, vinblastina	10, 50, 100 µM	28

Un ejemplo de producto purificado derivado de microorganismos es la coronatina, una toxina producida por algunas variedades patógenas de *Pseudomonas syringae*, que se ha estudiado por sus efectos como regulador de crecimiento y elicitor de la producción de metabolitos secundarios en plantas. En plántulas de *Lemna paucicostata* Hegelm cultivadas *in vitro*, la aplicación de coronatina incrementó la productividad de compuestos fenólicos como los ácidos isoferúlico, sinápico y cumárico, en este último se observó el efecto desde el día 27 de tratamiento y siguió incrementando hasta el día 32, en el cual todos los metabolitos presentaron su máxima productividad [9]. Los extractos celulares de hongos también son una fuente de elicitores bióticos. Cinco combinaciones diferentes de extracto celular y filtrado de cultivo del hongo endófito *Camarosporomyces flavigenus* se aplicaron a cultivos de células en suspensión de *Corylus avellana* L. para mejorar la síntesis y secreción del agente quimioterapéutico paclitaxel [10].

An example of a purified product derived from microorganisms is the Coronatine toxin, produced by some pathovars of *Pseudomonas syringae*, which has been studied for its effects as growth regulator and elicitor of secondary metabolites in plants. In *Lemna paucicostata* Hegelm seedlings cultivated *in vitro*, Coronatine application increased phenolic compound productivity, such as isoferulic, sinapic, and coumaric acids. In this latter metabolite, the effect was observed from day 27 of treatment and continued increasing up to day 32, in which all the metabolites showed their maximum productivity⁹. The fungal cellular extracts are also a source of biotic elicitors. Five different combinations of cellular extract and culture filtrate of the endophyte fungus *Camarosporomyces flavigenus* were applied to cell suspension culture of *Corylus avellana* L. to improve the synthesis and secretion of the chemotherapeutic agent paclitaxel [10].

Los jasmonatos, JA y MeJA, han sido ampliamente evaluados en los estudios de elicitación debido a su participación en la regulación de la síntesis de metabolitos secundarios en un amplio conjunto de especies vegetales, y pertenecen a las moléculas de señalización intracelular (abiótico), así como el ácido salicílico SA. Este último elicitor induce la producción de ácido rosmarínico a una concentración de 30 μM , su efecto en el contenido de este ácido fenólico con actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimutagénica sólo se observó en las plántulas expuestas por un período largo (20 d) [11]. En cultivos de células en suspensión de *Eschscholzia californica* Cham., la estimulación de la producción de sanguinarina y macarpina con SA fue dependiente de la dosis y tiempo de exposición. La máxima acumulación de estos alcaloides en la biomasa se observó con la dosis de 4 mg/L, después de 48 h (sanguinarina) y 72 h (macarpina); y estuvo relacionada con la inducción en la expresión de genes de enzimas biosintéticas [12]. El efecto del SA sobre la producción de azadiractina en cultivos de células en suspensión de *Azadirachta indica* A. Juss fue más marcado que el inducido por el JA; obteniendo un contenido máximo de este limonoide (tetranortriterpenoide) con actividad insecticida después de 6 días de incubación a una concentración de 0.75 mM de SA [13]. En contraste, la exposición del cultivo de células en suspensión de *E. longifolia* a la misma concentración de SA y MeJA (20 μM) estimula la máxima producción de euricomano, registrándose un incremento mayor en los cultivos elicitados con MeJA [5]. De forma similar, la adición de 50 μM de MeJA y 100 μM de SA a cultivos de células en suspensión de *Hypericum perforatum* L. incrementó 2.1 y 1.5 veces más el contenido de flavonoides, comparado con el testigo. El mejor momento para la adición del MeJA fue en la fase exponencial de crecimiento, en donde el crecimiento celular no se vio afectado y se registró la mayor producción de flavonoides [14].

Los iones, que pertenecen a los elicitores químicos, tienen un uso extendido como una estrategia de elicitación de la producción de compuestos bioactivos de diferente naturaleza, así como tanshinonas [4], sesquiterpenos [6], ácidos fenólicos [11,15] y flavonoides [7,14]. En estos estudios, la concentración del nitrato de plata (AgNO_3) varía en un intervalo de 0.5-10 mg/L, incrementando la producción de compuestos bioactivos a las concentraciones bajas (0.5-4 mg/L) en cultivos de células en suspensión y raíces, mientras que en plántulas se observó un efecto positivo a 5 y 10 mg/L (30 y 60 μM). Por otra parte, la adición de altas concentraciones de AgNO_3 produjo una disminución en el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales en cultivos de células en suspensión de *P. dactylifera*. Además,

The jasmonates, JA and MeJA have been widely assessed in elicitation studies due to their participation in the regulation of secondary metabolites synthesis in a wide set of plant species and belong to the intracellular signaling molecules (abiotic), as well as SA. This latter elicitor induces rosmarinic acid production at a concentration of 60 μM , whose positive effect in content of this phenolic acid with antioxidant, anti-inflammatory and antimutagenic activities was only observed in seedlings exposed for a long period of time (20 days) [11]. In cell suspension cultures of *Eschscholzia californica* Cham., the stimulation of sanguinarine and macarpine production with SA was dependent on dosage and time of exposure. The maximum accumulation of these alkaloids in biomass were observed with the dose of 4 mg/L after 48 h (sanguinarine) and 72 h (macarpine); and it was related to induction in gene expression of biosynthetic enzymes [12]. The SA effect on azadirachtin production in cell suspension cultures of *Azadirachta indica* A. Juss was more marked than that induced by JA, obtaining a maximum content of this limonoid (tetranortriterpenoid) with pesticide activity at a concentration 0.75 mM of SA after six days of incubation [13]. In contrast, the exposure of cell suspension cultures of *E. longifolia* at the same SA and MeJA concentration (20 μM) stimulates the maximum euricomano production, recording a greater increase in cultures elicited with MeJA [5]. Similarly, the addition of 50 μM of MeJA and 100 μM of SA to cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. increased 2.1 and 1.5 times more the flavonoid content compared with the control. The best moment to add MeJA was the exponential growth phase, where cellular growth was not affected and the highest flavonoid production was recorded [14].

The ions that belong to chemical elicitors have an extended use as an elicitation strategy of bioactive compound production of different nature, as well as tanshinones [4], sesquiterpenes [6], phenolic acids [11,15] and flavonoids [7,14]. In these studies, AgNO_3 concentration varied in an interval of 0.5-10 mg/L, increasing bioactive compound production to low concentrations (0.5-4 mg/L) in cell suspension and roots cultures, whereas a positive effect at 5 and 10 mg/L (30 and 60 μM) was observed in seedlings. On the other hand, the addition of high AgNO_3 concentrations produced a decrease in total phenolic and flavonoid contents in cell suspension cultures of *P. dactylifera*. Furthermore, this elicitor also had a negative impact in biomass accumulation, decreasing

este elicitor también tuvo un impacto negativo en la acumulación de biomasa, disminuyendo el peso seco conforme incrementó la concentración de AgNO_3 [7]. Una alternativa para disminuir la toxicidad de estos elementos sobre las células vegetales ha sido la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) y se ha evaluado su potencial para estimular la síntesis de compuestos bioactivos. En el cultivo de raíces transformadas de *Cucumis anguria* L. se observó diferencias en la producción de compuestos fenólicos con potente actividad antioxidante en respuesta a AgNO_3 y AgNP. En general, el incremento en el contenido de ácidos hidroxibenzoicos (protocatéuico, siríngico y vanílico), hidroxicinámicos (cumárico, ferúlico y clorogénico) y flavonoles (catequina y naringenina) fue mayor en los cultivos elicitados con AgNP que con AgNO_3 . Además, que la acumulación de biomasa también incrementa con respecto al testigo con las concentraciones más altas de AgNP (1 y 2 mg/L), mientras que a estas mismas concentraciones de AgNO_3 se observa una disminución [15].

El potencial del Cd, Ni, Pb y V para estimular la producción de metabolitos bioactivos también se ha evaluado en cultivos de células en suspensión y raíces adventicias. La adición de CdCl_2 a cultivos de *P. dactylifera* incrementa el contenido de flavonoides totales a la concentración más baja (50 mg/L), mientras que afecta negativamente la producción de fenólicos totales conforme aumenta la concentración [7]. En contraste, el contenido de flavonoides en cultivos de *H. perforatum* tratados con NH_4VO_3 y NiSO_4 no fue modificado, comparado con el testigo [14].

Algunos elicitores promueven la secreción de los compuestos al medio de cultivo, como en el caso de la aplicación de los ácidos acético (AA) y cítrico (AC) en el cultivo de callos de *E. elaterium*. No se observó acumulación de curcubitacinas en los callos, pero si hubo un incremento en el contenido de yoduro de cobre (CuI) al adicionar 0.16 mM AC o 16 mM AA; mientras que la producción de CuE sólo incrementó en el tratamiento con 16 mM de AC [8].

Por último, al aumentar el potencial osmótico añadiendo NaCl o manitol tuvo un efecto positivo en el contenido de limonoides y curcubitacinas, respectivamente. En el primer caso, el contenido más alto de la azadiractina fue registrado en el tratamiento con 100 mM de NaCl y en el tiempo de incubación más alto (12 d) [13]. La acumulación de CuI en callos de *A. indica* se observó a partir de la concentración de manitol más baja aplicada (10%), mientras que el contenido de CuE incrementó sólo con la concentración más alta

dry weight as AgNO_3 concentration increased [7]. An alternative to reduce the toxicity of these elements on plant cells have been silver nanoparticle synthesis (AgNPs), and their potential has been assessed to stimulate bioactive compounds synthesis. In the hairy root cultures of *Cucumis anguria* L., differences in the phenolic compounds production with powerful antioxidant activity were observed in response to AgNO_3 and AgNP. In general, the increase in hydroxybenzoic (protocatechuic, syringic, and vanillic acids), hydroxycinnamic (coumaric, ferulic, and chlorogenic) acids and flavonols (catechin and naringenin) were greater in the cultures elicited with AgNP than those with AgNO_3 . Moreover, biomass accumulation also increased compared to the control with the highest AgNP (1 and 2 mg/L) concentrations, whereas at these same AgNO_3 concentrations, a decrease was observed [15].

The potential of Cd, Ni, Pb, and V to stimulate bioactive metabolites production has also been evaluated in cell suspension and adventitious roots cultures. The addition of CdCl_2 to *P. dactylifera* cultures increases total flavonoid content at the lowest concentration (50 mg/L), while total phenolic production is affected negatively as concentration increases [7]. In contrast, flavonoids content in *H. perforatum* cultures treated with NH_4VO_3 and NiSO_4 was not modified compared with the control [14].

Some elicitors promote the secretion of the compounds into the culture medium, as in the case of acetic (AA) and citric (AC) acids application in callus culture of *E. elaterium*. No accumulation of curcubitacin was observed in callus biomass, but an increase in CuI content was observed when 0.16 mM AC or 16 mM AA was added while the production of CuE only increased in the treatment with 16 mM AC [8].

Lastly, when the osmotic potential increased by adding NaCl or mannitol, a positive effect was observed in limonoid and curcubitacin contents, respectively. In the first case, the highest content of azadirachtin was recorded in the treatment with 100 mM of NaCl and in the highest incubation time (12 days) [13]. The accumulation of CuI in *E. elaterium* callus was observed from the lowest applied mannitol concentration (10%), whereas CuE content increased only with the highest (30%) concentration. The

(30%). En el tratamiento con 20% de manitol también se registró el aumento del contenido de Cul en el medio de cultivo [8].

Producción de metabolitos bioactivos *in-planta*

El consumo de frutas y verduras está asociado a un menor riesgo de padecer enfermedades crónicas. En general, se han establecido tres maneras principales de mejorar la calidad de los cultivos que se consumen en fresco, estos son: la modificación genética, el manejo agronómico (especialmente la fertilización) y la elicitación [16]. Sin embargo, existe una falta de aceptación pública por parte de los consumidores hacia los alimentos transgénicos, por lo que, la elicitación se ha convertido en una opción eficaz para mejorar la resistencia de las plantas al estrés biótico y abiótico, así como para mejorar la calidad de los órganos vegetales comestibles, principalmente en lo relacionado con los compuestos bioactivos que son benéficos para la salud. Aunque, existe una serie de factores como el genotipo de la planta, las prácticas agrícolas y las condiciones climáticas que impactan en la calidad de los cultivos, especialmente en el contenido de fitoquímicos.

La elicitación ha sido ampliamente utilizada en cultivo *in vitro* para aumentar la producción o inducir la síntesis de *novos* de metabolitos secundarios específicos y recientemente ha crecido el interés por emplear la elicitación como un método para mejorar la calidad de toda la planta comestible. Algunos de los elicitores más utilizados, con efectos positivos en la acumulación de fitoquímicos, en ciertos cultivos, consisten en la aplicación exógena de ciertos reguladores del crecimiento como JA, MeJA, SA y ASA. Un ejemplo es la aplicación de JA, ácido abscísico (ABA) y ácido araquidónico (AA) en la producción de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Los tratamientos se aplicaron de manera foliar y se encontró que 1 y 100 μM JA incrementó el contenido de compuestos fenólicos totales en hojas de lechuga. Específicamente, la aplicación de AA incrementó el contenido de ácido cafeico, ácido clorogénico; mientras que la concentración más alta de JA (100 μM) favoreció la acumulación de quercetina, luteolina y los ácidos ferúlico, cafeico, clorogénico y o-cumárico [16]. En otro estudio, la aplicación foliar de MeJA (500 μM) a plantas de col china, conocida como pak choi (*Brassica Rapa* subsp. *Chinensis*), incrementó la concentración de neoglucobrasicina, un indol glucosinolato, de los glucosinolatos alifáticos progoitrina y glucobrassicinapin [17]; así como del glucosinolato aromático gluconasturtina [20]. El contenido de neoglucobrasicina también incrementó en brócoli (*Brassica oleracea* L.) con una aplicación exógena de 250 μM MeJA [19].

treatment with 20% mannitol also recorded an increase of Cul content in the culture medium [8].

Production of *in-plant* bioactive metabolites

Fruits and vegetables consumption is associated to lower risk of suffering chronic diseases. In general, three main ways of improving quality of crops consumed fresh are (1) modifying genetics; (2) agronomic management (especially fertilization); and (3) elicitation [16]. However, a lack of public acceptance exists by consumers towards transgenic food. Thus, elicitation has turned into an efficient option to improve plant resistance to biotic and abiotic stress, as well as improve quality of edible plant organs mainly related with bioactive compounds that are beneficial for health. Nevertheless, a series of factors exist, such as plant genotype, agricultural practices and climate conditions that impact in the crop quality, especially in phytochemicals content.

Elicitation has been widely used in plant *in vitro* cultures to increase production or induce *de novo* synthesis of specific secondary metabolites. Recently, the interest has grown to use elicitation as a method to improve quality of all edible plants. Some of the most used elicitors, with positive effects in phytochemical accumulation in certain crops, consist of exogenous application of growth regulators as JA, MeJA, SA and ASA; one example is the application of JA, abscisic acid (ABA) and arachidonic acid (AA) in lettuce (*Lactuca sativa* L.) production. Treatments were applied via foliar, finding that 1 and 100 μM JA increased total phenolic compounds in lettuce leaves. Specifically, AA application increased caffeic and chlorogenic acid contents; whereas the highest JA (100 μM) concentration favored the accumulation of quercetin, luteolin, ferulic, caffeic, chlorogenic and o-coumaric acids [16]. In another study, foliar application of MeJA (500 μM) to Chinese cabbage plants, known also as pak choi (*Brassica rapa* subsp. *Chinensis*), increased the content of neoglucobrassicin (an indole glucosinolate), progoitrin and glucobrassicinapin (aliphatic glucosinolates) [17], as well as gluconasturtin (aromatic glucosinolate) [20]. The content of neoglucobrassicin also increased in broccoli (*Brassica oleracea* L.) with an exogenous application of 250 μM MeJA [19].

In pomegranate (*Punica granatum* L.) production, elicitation has also been used with foliar spraying of 5 mM MeJA, increasing total phenolic compounds, total

En la producción de frutos la granada (*Punica granatum* L.) también se ha usado la elicitación, con la aspersión foliar de 5 mM MeJA se aumentó el contenido de compuestos fenólicos totales, antocianinas totales y antocianinas específicas (Dp 3,5-di-glu, Cy 3,5-di-glu, Dp 3-glu, Cy 3-glu) en arilos de granada [20]. En este cultivo se empleó el déficit hídrico, como un elicitor físico, y se encontró que un régimen hídrico del 50% incrementó el contenido de delphinidina-3,5-diglc, delphinidina-3-glc, galloilhex, casuarinina y ácido elálgico en el jugo de granada [21]. En un sistema de elicitación similar en plantas de lechuga, se obtuvo que un déficit de riego del 50% favoreció la acumulación de los ácidos chicórico, clorogénico, cafeico y catártico, así como de kaempferol, quercetina y miricetina, de una manera dependiente del genotipo [22].

La aplicación exógena de 50 μ M de melatonina, asperjada en hojas y frutos de cereza dulce (*Prunus avium* L.), aumentó la acumulación de compuestos fenólicos totales y flavanoles totales en frutos con la aplicación a las hojas de las plantas, comparado con la aspersión directamente a los frutos [23]. La elicitación de plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) con la aplicación de esporas de *Trichoderma* favoreció la acumulación de los ácidos shikímico, gálico, clorogénico, siríngico y ferúlico, así como de daidzeína y kaempferol [24].

La producción de germinados ha surgido como un proceso eficaz para obtener alimentos de mejor calidad nutricional y nutracéutica. Bajo este sistema también se ha implementado el uso de elicitores para incrementar el contenido de metabolitos secundarios. Como es el caso de los germinados de alubia roja (*Phaseolus vulgaris* L.), se utilizaron elicitores de naturaleza biótica, como el quitosano y el ácido glutámico, y aumentaron el contenido de compuestos fenólicos solubles y del ácido γ -aminobutírico [26]. El selenito de sodio (Na_2SeO_3) se ha utilizado como elicitor químico para la obtención de germinados de soja (*Glycine max* L.) con mayor contenido de isoflavonas como la genisteína malonilada y los glucósidos de daidzeína malonilada [27].

También se ha usado la elicitación para la obtención de compuestos con potencial farmacológico como la vincristina y vinblastina, alcaloides comúnmente usados contra el cáncer. Se utilizó el cromo (Cr) como elicitor químico y se encontró que 50 μ M Cr incrementó el contenido ambos compuestos en la parte aérea de las plantas de

anthocyanins and specific anthocyanins (Dp 3,5-di-glu, Cy 3,5-di-glu, Dp 3-glu, Cy 3-glu) in pomegranate arils [20]. The water deficit regime of 50% was used in this crop as a physical elicitor, finding a content of delphinidin-3,5-diglc, delphinidin-3-glc, galloyl-hex, casuarinin and ellagic acids in pomegranate juice [21]. In a similar elicitation system in lettuce plants, a 50% irrigation deficit favored the accumulation of chicoric, chlorogenic, caffeic and cathartic acids, as well as kaempferol, quercetin and myricetin, independently of the genotype [22].

The exogenous application of 50 μ M of melatonin, sprayed on leaves and fruits of sweet cherry (*Prunus avium* L.), increased accumulation of total phenolic and flavonoid contents in fruits with the application to plant leaves, compared to directly spraying the fruit²³. Elicitation of chili pepper plants (*Capsicum annuum* L.) with the application of *Trichoderma* spores favored the accumulation of shikimic, gallic, chlorogenic, syringic and ferulic acids, as well as daidzein and kaempferol [24].

The sprouts production has emerged as an efficient process to obtain better nutritional and nutraceutical quality food. Under this system, the use of elicitors has also been implemented to increase secondary metabolites content. Such is the case of red bean sprouts (*Phaseolus vulgaris* L.), where natural biotic elicitors were used, as chitosan and glutamic acid increasing soluble phenolic contents and γ -aminobutyric acid [26]. Sodium selenite (Na_2SeO_3) has been used as chemical elicitor to obtain soybean sprouts (*Glycine max* L.) with greater content of isoflavones, such as malonyl genistein and malonyl daidzein glucosides [27].

Moreover, elicitation has been used to obtain potential pharmacological compounds, such as vincristine and vinblastine, commonly used alkaloids against cancer. Chrome (Cr) was used as chemical elicitor, finding that 50 μ M Cr increased contents of both compounds in the aerial part of *Catharanthus roseus* (L.) plants, while the best treatment for root was 100 μ M Cr [28].

In the different cultivation systems, another promising tool is added to the abiotic elicitors previously mentioned to improve quality and quantity of secondary metabolites in plants. Nanomaterials emerge as efficient elicitors both in specificity and productivity terms. Nevertheless, for the production of plant phytochemicals at commercial level, several

Catharanthus roseus (L.); mientras que el mejor tratamiento para la raíz fue de 100 μ M Cr [28].

A los elicitores abióticos previamente mencionados, en los diferentes sistemas de cultivo, se suma otra herramienta prometedora para mejorar la calidad y la cantidad de metabolitos secundarios en plantas. Los nanomateriales surgen como elicitores eficientes tanto en términos de su especificidad como de su productividad. Aunque, para la producción de fitoquímicos vegetales a niveles comerciales, es importante considerar varios factores como el tamaño, la morfología, la concentración, el tiempo de exposición, la especie vegetal y las condiciones de cultivo. Sin embargo, el efecto de los nanomateriales en la producción de compuestos bioactivos está poco estudiado y surge como un campo de estudio para la investigación de tópicos como su combinación con otros elicitores abióticos/bióticos.

Finalmente, los elicitores corresponde a varias clases de compuestos, algunas de sus características es que no comparten una estructura química común y pueden inducir o potenciar la biosíntesis de compuestos bioactivos específicos. Además, existen diversos parámetros y factores que determinan la eficacia de la elicitación en la producción de biomasa vegetal y metabolitos secundarios, como el tipo y la selectividad de elicitor, la concentración, el tiempo de exposición, la edad y fase de crecimiento del cultivo en el que se adiciona, el sistema de producción (*in vitro* o agrícola), el tipo de cultivo o la línea celular, la composición nutrimental del medio de crecimiento o la fertilización, la presencia o ausencia de reguladores de crecimiento, los componentes de la pared celular al momento de la aplicación de los elicitores [2,29]. Aunque, el uso de los elicitores para incrementar el contenido de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* e in-planta está siendo explorado ampliamente, aún se requieren más estudios debido a que las plantas contienen una gran diversidad de fitoquímicos que pueden ser aprovechados en la industria farmacéutica, alimentaria y agroindustrial.

factors must be considered, such as size, morphology, concentration, exposure time, plant species and culture condition. However, the effect of nanomaterials in the bioactive compounds production has been little studied, emerging as a novel field of study to diverse topics research as their combination with other abiotic/biotic elicitors.

Finally, elicitors correspond to different classes of compounds and some of their characteristics are that they do not share a common chemical structure and may induce or enhance the biosynthesis of specific bioactive compounds. Furthermore, diverse parameters and factors exist that determine elicitation efficacy in plant biomass production and secondary metabolites, for example, type and selectivity of the elicitor, concentration, time of exposure, age and growth phase of the cultures for adding elicitor, the production system (*in vitro* or agricultural), type of culture or cellular line, nutrimental composition of growth medium or fertilization, presence or absence of growth regulators, and cell wall components at the moment of applying the elicitors [2,29]. Although the use of elicitors has been widely explored to enhance the secondary metabolites production under *in vitro* and *in-plant* cultures, more studies are still required due to plants contain a great diversity of phytochemicals that may be exploited in the pharmaceutical, food and agricultural industries.

Referencias References

1. Thakur M, Bhattacharya S, Kholsa PK, *et al.* (2019) Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *J Appl Res Med Aromat Plants* 12:1-12
2. Halder M, Sarkar S, Jha S (2019) Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Eng Life Sci* 19:880-895
3. Ramírez-Estrada K, Vidal-Limon H, Hidalgo D, *et al.* (2016) Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules* 21(2): 182-205
4. Zaker A, Sykora C, Gossnitzer F *et al.* (2015) Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel. *Ind Crops Prod* 67: 97-102
5. Nhan NH, Loc NH (2018) Enhancement of eurycomanone biosynthesis in cell culture of longjack (*Eurycoma longifolia*) by elicitor treatment. *J Plant Biotechnol* 45: 340-346
6. Pourianezhad F, Rahnama H, Mousavi A, *et al.* (2019) Parthenolide production in cell suspension culture of feverfew. *Bioresour Bioprocess* 6: 23-29
7. Al-Khayri JM, Naik PM (2020) Elicitor-induced production of biomass and pharmaceutical phenolic compounds in cell suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Molecules* 25: 4669-4679
8. El-Mekawy S, Farid MM, Taha HS, *et al.* (2018) Effect of different plant growth regulators and elicitors on the production of cucurbitacins in *Ecballium elaterium* callus. *J Mater Environ Sci* 9(9): 2529-2538
9. Kim JY, Kim HY, Jeong JY, *et al.* (2017) Effects of coronatine elicitation on growth and metabolic profiles of *Lemna paucicostata* culture. *Plos One* 12(11): 1-15
10. Salehi M, Moieni A, Safaie N, *et al.* (2020) Whole fungal elicitors boost paclitaxel biosynthesis induction in *Corylus avellana* cell culture. *Plos One* 15(7): 1-17
11. Pedroso RCN, Pimenta LP, Tozatti MG, *et al.* (2019) Effects of light quality and chemical elicitors on the growth parameters and rosmarinic acid content of in vitro cultures of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. *J Braz Chem Soc* 30(11): 2430-2437
12. Balazová A, Urdová J, Forman V, *et al.* (2020) Enhancement of macarpine production in *Eschscholzia californica* suspension cultures under salicylic acid elicitation and precursor supplementation. *Molecules* 25: 1261-1273
13. Garoosi G, Gholami B, Hosseini R (2016) Considerable azadirachtin production in Neem cell culture under abiotic elicitor induction. *J Med Plants By-Prod* 2: 195-204
14. Wang J, Qian J, Yao L, *et al.* (2015) Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresour Bioprocess* 2: 5-13
15. Chung IM, Rajakumar G, Thiruvengadam M (2018) Effect of silver nanoparticles on phenolic compounds production and biological activities in hairy root cultures of *Cucumis anguria*. *Acta Biol Hung* 69(1): 97-109
16. Zlotek U, Swieca M, Jakubczyk A (2014) Effect of abiotic elicitation on main health-promoting compounds, antioxidant activity and commercial quality of butter lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Food Chem* 148:253-260
17. Kim MJ, Chiu Y-C, Kim NK, *et al.* (2017) Cultivar-specific changes in primary and secondary metabolites in pak choi (*Brassica Rapa*, *Chinensis* group) by methyl jasmonate. *Int J Mol Sci* 18:1004
18. Baek MW, Choi HR, Solomon T, *et al.* (2021) Preharvest methyl jasmonate treatment increased the antioxidant activity and glucosinolate contents of hydroponically grown pak choi. *Antioxidants* 10:131.
19. Chiu Y-C, Matak K, Ku K-M (2020) Methyl jasmonate treatment of broccoli enhanced glucosinolate concentration, which was retained after boiling, steaming, or microwaving. *Foods* 9:758

20. García-Pastor ME, Serrano M, Guillén F, *et al.* (2020) Preharvest application of methyl jasmonate increases crop yield, fruit quality and bioactive compounds in pomegranate 'Mollar de Elche' at harvest and during postharvest storage. *J Sci Food Agric* 100:145-153
21. Tarantino A, Difonzo G, Lopriore G, *et al.* (2020) Bioactive compounds and quality evaluation of 'Wonderful' pomegranate fruit and juice as affected by deficit irrigation. *J Sci Food Agric* 100:5539-5545
22. Malejane DN, Tinyani P, Soundy P, *et al.* (2018) Deficit irrigation improves phenolic content and antioxidant activity in leafy lettuce varieties. *Food Sci Nutr* 6:334-341
23. Xia H, Shen Y, Shen T, *et al.* (2020) Melatonin Accumulation in Sweet Cherry and Its Influence on Fruit Quality and Antioxidant Properties. *Molecules* 25:753
24. Saxena A, Mishra S, Ray S, *et al.* (2020) Differential Reprogramming of defense network in *Capsicum annum* L. plants against *Colletotrichum truncatum* infection by phyllospheric and rhizospheric *Trichoderma* strains. *J Plant Growth Regul* 39:751-763
25. Limón RI, Peñas E, Martínez-Villaluenga, *et al.* (2014) Role of elicitation on the health-promoting properties of kidney bean sprouts. *LWT-Food Sc Technol* 56:328-334
26. Lazo-Vélez MA, Guardado-Félix D, Avilés-González J, *et al.* (2018) Effect of germination with sodium selenite on the isoflavones and cellular antioxidant activity of soybean (*Glycine max*). *LWT* 93:64-70
27. Rai V, Tandon PK, Khatoon S (2014) Effect of chromium on antioxidant potential of *Catharanthus roseus* varieties and production of their anticancer alkaloids: vincristine and vinblastine. *Biomed Res Int* 2014:934182
28. Singh A, Dwivedi P (2018) Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: A review. *J Pharmacogn Phytochem* 7:750-757

Capítulo II

Panorama Actual de los Bioestimulantes Agrícolas

Current Overview of Agricultural Biostimulants

Soledad García-Morales^{1*}, Víctor García-Gaytán², Janet María León-Morales¹

¹Biología Vegetal, CONACYT-Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México, CP 45019. ²El Colegio de Michoacán (LADiPA), Cerro de Nahuatzen 85, La Piedad de Cavadas, Michoacán de Ocampo, México, CP 59370. *Autor correspondencia: smorales@ciatej.mx

Introducción

Con el crecimiento de la población nacional y mundial, también ha aumentado la demanda de alimentos, lo que ha propiciado que en los sistemas de producción convencional se use un exceso de productos agroquímicos para aumentar el rendimiento de los cultivos. Este tipo de prácticas agrícolas ha provocado un impacto altamente negativo en la calidad del suelo, causando el deterioro de los ecosistemas terrestres y acuáticos. Por otro lado, la agricultura moderna requiere de un replanteamiento sobre sus prácticas y modelos de negocio, incluyendo a diferentes sectores, las cadenas de valor y la industria de base biológica, como una estrategia de economía circular donde se valoriza los productos y subproductos agrícolas bajo un perfil medioambiental [1].

Ante esta situación, es necesario buscar alternativas que de alguna manera puedan sustituir a los fertilizantes inorgánicos, de origen químico, sin que esto represente un efecto negativo en la producción, calidad y rendimiento de los cultivos y sin causar un demérito en el ingreso económico de los productores. En este sentido, una opción que está generando interés es el uso de sustancias y/o microorganismos que son conocidos como bioestimulantes vegetales [2]. Estos productos son capaces de potenciar el uso de los elementos esenciales por parte del cultivo, así como amortiguar los efectos adversos causados por el estrés abiótico y favorecer la calidad de los frutos, verduras y en general las partes comestibles de los cultivos.

Por lo tanto, los bioestimulantes representan una opción sostenible y eficiente, que pueden ser aprovechados como un complemento de sus homólogos sintéticos (los productos agroquímicos), con la finalidad de mejorar la eficiencia en el uso de los nutrientes esenciales y asegurar la rentabilidad de los cultivos agrícolas tanto en condiciones óptimas como subóptimas. Además, esta nueva tecnología permite mejorar la eficiencia en el uso de los recursos hídricos, así como garantizar la seguridad alimentaria, aunado a la preservación de la calidad del suelo y ofrecer oportunidades de negocio a los agricultores [3].

Introduction

With national and world population growth, food demand has also increased, which has given rise to conventional production systems using an excess of agrochemical products to increase crop yield. This type of agricultural practices has caused a highly negative impact on soil quality and deterioration of terrestrial and aquatic ecosystems. On the other hand, modern agriculture requires to reconsider its practices and business models, including different sectors, value chains and bio-based industries as a circular economic strategy where agricultural products and subproducts are valued under an environmental profile [1].

Facing this situation, alternatives should be searched, which in a way may substitute inorganic chemical fertilizers without representing a negative effect in crop production quality and yield and/or causing shortcoming in the producers' economic income. In this sense, an option generating interest is the use of substances and/or microorganisms that are known as plant biostimulants [2]. These products are capable of enhancing the use of essential elements by the crop, as well as mitigating adverse effects caused by abiotic stress and favoring quality of fruit, vegetables and, in general, edible parts of crops.

Therefore, biostimulants represent a sustainable and efficient option that may be exploited as a complement of their synthetic counterparts (agrochemical products). Their objective is to improve efficiency of essential nutrient use and assure the cost effectiveness of agricultural crops, both in optimal and suboptimal conditions. Furthermore, this new technology allows improving efficiency in the use of hydric resources, as well as guaranteeing food security, jointly with soil quality conservation, and offering business opportunities to farmers [3].

At the beginning, plant biostimulants were used in ecological crop production. Now, they are currently

Al inicio, los bioestimulantes vegetales se usaron en la producción ecológica de cultivos; actualmente, se utilizan en varios sistemas de producción, tanto en la agricultura convencional como en la producción integral de cultivos. Los bioestimulantes se pueden utilizar de manera eficaz tanto en cultivos hortícolas como de cereales y frutales [1].

El mercado de los bioestimulantes está siendo muy prolífico, que aumenta cada año, los productos con mayor potencial económico son los bioestimulantes con ingredientes activos, como aminoácidos, extractos de algas, sustancias húmicas y enmiendas microbianas. En 2019, estos productos representaron un valor de 2.6 billones de dólares y se pronostica que para 2025 alcance alrededor de 5 billones de dólares, con una tasa anual de crecimiento de 11.2% [1, 3].

Definición y clasificación de los bioestimulantes

Aunque existen varias definiciones sobre los bioestimulantes, la proporcionada por du Jardin [4] considera un consenso entre varios actores clave (extensionistas, empresas comerciales, comunidad científica): “Un bioestimulante vegetal es cualquier sustancia o microorganismo aplicado a las plantas con el objetivo de mejorar la eficiencia nutricional, la tolerancia al estrés abiótico y/o las características de calidad del cultivo independientemente de su contenido en nutrimentos”, este autor también sugiere que dicha definición podría completarse con la siguiente información “los bioestimulantes vegetales también designan los productos comerciales que contienen mezclas de dichas sustancias y/o microorganismos”. Además, se hace un par de observaciones a esta definición: 1) la naturaleza de los bioestimulantes no es restrictiva, ya que puede ser una sustancia o un microorganismo; 2) Una sustancia puede ser un solo compuesto químico o un grupo de compuestos con un origen biológico bien establecido, en el caso de los extractos vegetales, no necesariamente deben contar con una composición totalmente caracterizada [4].

Mientras que Drobek *et al.* [5] mencionan que los bioestimulantes se pueden considerar como un aditivo de los fertilizantes, que favorecen la absorción de los nutrimentos, promueven el crecimiento de las plantas y aumentan la tolerancia al estrés abiótico. Estos autores también mencionan que la definición de bioestimulante es amplia y no es suficientemente precisa. Aunque hacen la precisión de que hay dos características principales que distinguen a los bioestimulantes de otros agentes de crecimiento y protección de las plantas, indicando que un bioestimulante puede ser cualquier sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o de microorganismos que mejore la condición de los cultivos sin causar efectos secundarios adversos [5].

De acuerdo con el nuevo Reglamento europeo (2019/1009) sobre fertilizantes, que fue aprobado recientemente por el Parlamento Europeo, los bioestimulantes vegetales se

used in several production systems both in conventional agriculture and integral crop production. Biostimulants may also be used efficiently in horticultural, cereal, and fruit crops [1].

The biostimulant market has been very prolific and keeps increasing every year. The products with greater economic potential are biostimulants with active ingredients, such as amino acids, algal extracts, humic substances, and microbial amendment. In 2019, these products represented a value of USD 2.6 billion and are forecasted to have reached approximately USD 5 billion by 2025, with an annual growth rate of 11.2% [1, 3].

Definition and classification of biostimulants

Although several definitions exist on biostimulants, the one provided by du Jardin [4] considered a consensus among several key actors (extensionists, commercial enterprises, scientific community): “A plant biostimulant is any substance or microorganism applied to plants with the aim to enhance nutrition efficiency, abiotic stress tolerance and/or crop quality traits, regardless of its nutrients content”. This same author also suggested that such definition could be completed with the following information: “plant biostimulants also designate commercial products containing mixtures of such substances and/or microorganisms”. Additionally, a couple of observations were made to this definition: (1) nature of biostimulants is not restrictive since it may be a substance or a microorganism; (2) a substance may be only a chemical compound or a group of compounds with a well-established biological origin, in the case of plant extracts, not necessarily must they have a totally characterized composition [4].

On the other hand, Drobek *et al.* [5] mentioned that biostimulants can be considered as an additive to fertilizers, which enhance nutrient uptake, promote plant growth, and increase abiotic stress tolerance. These authors also mentioned that the biostimulant definition is wide but not accurate enough. Nevertheless, they clarified that there are two main characteristics distinguish biostimulants from other plant growth and protection agents, indicating that a biostimulant may be any substance or mixture of substances of natural origin or microorganisms that improve crop conditions without causing adverse secondary effects [5].

According to the new European Regulation (2019/1009) on fertilizers, which was recently approved by the European Parliament, plant biostimulants are defined as any “EU fertilising product the function of which is to stimulate plant nutrition

definen como cualquier “producto que estimule los procesos nutricionales de las plantas, independientemente de su contenido nutrimental, para mejorar una o varias de las siguientes características de la planta o de la rizosfera: a) eficiencia en el uso de nutrientes, b) tolerancia al estrés abiótico, c) características cualitativas de calidad y d) disponibilidad de nutrientes confinados en el suelo o en la rizosfera” (Figura 1) [1-3].

Los productos que están catalogados como bioestimulantes para las plantas son sustancias naturales y derivados de naturaleza química de compuestos naturales o sintéticos, así como microorganismos benéficos, entre ellos destacan 1) sustancias húmicas; 2) hidrolizados de proteínas de origen vegetal o animal; 3) extractos de macro y microalgas; 4) silicio; 5) hongos micorrícicos arbusculares (HMA); y 6) rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) [1, 3]. Los bioestimulantes se han clasificado de manera general o considerando aspectos como su naturaleza y su fuente origen (Cuadro 1, Figura 1).

processes independently of the product’s nutrient content with the sole aim of improving one or more of the following characteristics of the plant and/or the plant rhizosphere: (1) nutrient use efficiency, (2) tolerance resistance to (a)biotic stress, (3) quality characteristics, or (4) availability of confined nutrients in the soil or rhizosphere” [1-3].

The products catalogued as plant biostimulants are natural substances and chemicals derivatives of natural or synthetic compounds, as well as beneficial microorganisms, among which those that stand out are (1) humic substances; (2) protein hydrolysates from plant or animal origin; (3) macro and microalgal extracts; (4) silicon; (5) arbuscular mycorrhizal fungi (AMF); and (6) plant growth promoter rhizobacteria (PGPR) [1, 3]. Biostimulants are classified in general terms or considering aspects such as their nature or source origin (Table 1, Figure 1).

Cuadro 1. Clasificación de los bioestimulantes vegetales.

Table 1. Classification of plant biostimulants

Referencia	Clasificación
4	<p>Clasificación general</p> <ul style="list-style-type: none"> Sustancias: ácidos húmicos y fúlvicos, hidrolizados de proteínas y otros compuestos que contienen N, extractos de algas y plantas, quitosano y otros biopolímeros y compuestos inorgánicos (como los elementos benéficos: Al, Co, Na, Se y Si). Microorganismos: hongos benéficos (como los HMA), bacterias benéficas (como las del género <i>Rhizobium</i> y las denominadas PGPRs).
5	<p>Clasificación por su naturaleza:</p> <ul style="list-style-type: none"> Naturales: Compuestos fenólicos, ácidos húmicos y fúlvicos, hidrolizados proteicos. Microorganismos: hongos como <i>Glomus intraradices</i>, <i>Trichoderma atroviride</i>, <i>Trichoderma reesei</i> y <i>Heteroconium chaetospira</i>; bacterias de los géneros <i>Arthrobacter</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Ochrobactrum</i> spp., <i>Bacillus</i> spp. y <i>Rhodococcus</i> spp. Otros: enzimas, proteínas, aminoácidos, micronutrientes y otros compuestos.
3	<p>De acuerdo con la definición del Reglamento europeo (2019/1009)</p> <ul style="list-style-type: none"> Sustancias naturales bioactivas: ácidos húmicos y fúlvicos, hidrolizados de proteínas animales y vegetales, extractos de macroalgas marinas y silicio. Microorganismos benéficos: HMA, bacterias fijadoras de las cepas pertenecientes a los géneros <i>Rhizobium</i>, <i>Azotobacter</i> y <i>Azospirillum</i>.
6	<p>Clasificación por su fuente de origen</p> <ul style="list-style-type: none"> Fuente microbiana: Consorcios de hongos y bacterias, HMA, productos fermentados y residuos orgánicos. Fuente no microbiana: productos y extractos vegetales, extractos de algas marinas, hidrolizados de proteínas, aminoácidos, sustancias no proteicas, ácidos húmicos y fúlvicos.

Cuando los bioestimulantes se aplican correctamente a los cultivos, estos actúan directamente sobre los procesos fisiológicos de las plantas, aportando beneficios adicionales para el crecimiento, desarrollo y/o la respuesta de las plantas al estrés abiótico. Sin embargo, es importante recalcar que los bioestimulantes vegetales no se pueden

When biostimulants are applied correctly to crops, they act directly on the plant physiological processes, contributing to additional growth benefits and/or plant abiotic stress response. However, it is important to highlight that plant biostimulants cannot be defined as fertilizers, since they do not provide nutrients directly

definir como fertilizantes porque no proporcionan nutrimentos directamente a las plantas, pero sí pueden facilitar su adquisición, favoreciendo los procesos metabólicos en el suelo y las plantas, como es el caso de los HMA que contribuyen al transporte de nutrientes hacia la planta huésped [5].

Métodos de aplicación de los bioestimulantes

En general, los métodos de aplicación de los bioestimulantes se pueden dividir en aplicación radicular, frecuentemente al suelo, y aplicación foliar. Los bioestimulantes que están en forma de polvos, gránulos o soluciones se pueden utilizar en forma de preparados para su aplicación directa al suelo, de la misma manera que los bioestimulantes que contienen sustancias húmicas y compuestos nitrogenados. Los bioestimulantes se pueden aplicar al suelo mediante sistemas de riego para que las plantas los absorban junto con el agua [7]. Mientras que los bioestimulantes que provienen de extractos de plantas y algas o ácidos fúlvicos se aplican de manera foliar [5]. La aplicación foliar de los bioestimulantes genera una respuesta relativamente rápida o a corto plazo en la planta debido a que entran en contacto directo con la parte aérea, estimulando su metabolismo. Existe una tendencia creciente hacia la aplicación foliar de los bioestimulantes como una estrategia para mejorar su eficiencia, comparado con el suministro al suelo, en términos de velocidad de respuesta, ya que este último método es ideal para efectos a largo plazo [8].

La frecuencia de aplicación de los bioestimulantes depende de varios factores, aunque regularmente se utilizan durante todo el periodo vegetativo, o una vez que las plantas llegan a una etapa donde su capacidad productiva se ve mermada. Los bioestimulantes también son aplicados cuando se da la incidencia de un factor de estrés abiótico como estrés hídrico o estrés por temperaturas extremas [7]. En estos casos la aplicación de bioestimulantes foliares es más común, aunque es importante señalar que cada cultivo puede responder de manera diferente a la aplicación de los bioestimulantes [9].

Otra situación que se debe tomar en cuenta es el momento del día para la aplicación de los bioestimulantes, generalmente se deben de aplicar durante el transcurso de la mañana, ya que es cuando los estomas se mantienen abiertos y la tasa de absorción y asimilación es mayor por parte de las plantas. Aunque los bioestimulantes también se pueden aplicar a las semillas para mejorar la germinación, a las raíces de las plántulas antes del trasplante, así como a los frutos cosechados para disminuir daños mecánicos, evitar su descomposición y prolongar su vida de almacenamiento [10].

to plants, but they may facilitate their acquisition, favoring the metabolic processes in soil and plants, as in the case of AMF that contribute to nutrient transport toward the host plant [5].

Application methods of biostimulants

In general, biostimulant application methods can be divided into root application -often to the soil- and foliar application. The biostimulants in the form of powder, granules, or solutions may be used in preparations for their direct application on soil, similarly to those that contain humic substances and nitrogen compounds. Biostimulants may be applied to soil by irrigation systems, so they uptake them jointly with water [7], whereas, those that come from plant and algal extracts or fulvic acids are foliar applied [5]. Foliar application of biostimulant generates a relatively fast or short-term response in the plants because they enter in direct contact with the aerial part, stimulating its metabolism. A growing tendency exists toward foliar application of biostimulant as a strategy to improve their efficiency, compared to soil application in terms of speed of response since this last method is ideal for long-term effects. [8].

Biostimulant application frequency depends on several factors although they are regularly used during the growing plant season or once the plants reach a stage where their productive capacity is reduced. Biostimulants are also applied when an incidence of an abiotic stress factor as water stress or extreme temperature stress is observed [7]. In these cases, the foliar application of biostimulant is more common although it is important to highlight that each crop may respond differently to the biostimulant application [9]. Another situation that should be taken into account is the time of day for the application of biostimulants.

They should generally be applied during the morning since this time is when stomata remain open and the rate of absorption and assimilation is higher by the plants. However, biostimulants may also be applied to seeds to improve germination, to seedling roots before transplanting, as well as to harvested fruit to decrease mechanical damage, avoid decomposition, and extend their storage life [10].

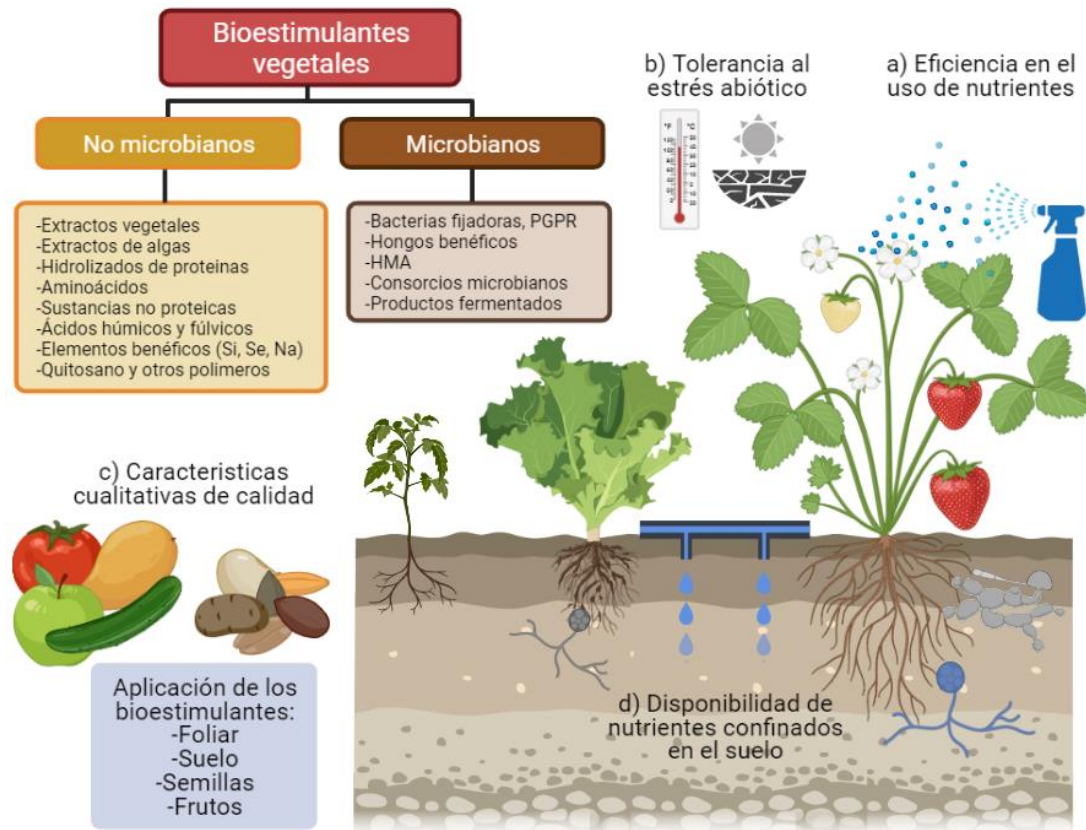


Figura 1. Bioestimulantes vegetales utilizados en la producción de cultivos. Características, clasificación por su origen y métodos de aplicación. Diagrama creado en BioRender.com

Figure 1. Plant biostimulants used in crop production. Characteristics classified by origin in application methods. Diagram created in BioRender.com

Efecto de los bioestimulantes en los cultivos agrícolas

En la última década, la industria de los bioestimulantes vegetales ha crecido de forma sostenida en el sector agrícola y se ha convertido en una de las estrategias emergentes más importantes para mejorar el rendimiento y la calidad de los cultivos, así como incrementar la resistencia al estrés biótico y abiótico. Debido a las propiedades de los bioestimulantes, ha crecido el interés en su uso, ya que estimulan los procesos fisiológicos y bioquímicos de los cultivos, como proporción de pigmentos fotosintéticos, fortalecimiento del sistema antioxidante, mejor crecimiento de las raíces y mayor eficiencia en el uso de los nutrientes (NUE). Además, los bioestimulantes tienen la capacidad de alterar las rutas del metabolismo primario y secundario de las plantas, lo que potencializa el rendimiento en un breve periodo de tiempo y de forma rentable [6]. Estas características han generado que los bioestimulantes sean aplicados en sistemas agrícolas intensivos que podrían reducir el uso de fertilizantes sin afectar la calidad y el rendimiento de los cultivos. Actualmente, los

Biostimulant effect on agricultural crops

In the last decade, the plant biostimulant industry has grown sustainably in the agricultural sector and has turned out to be one of the most important emerging strategies to improve crop yield and quality, as well as increase biotic and abiotic stress resistance. Due to the properties of biostimulants, interest in their use has grown since they stimulate physiological and biochemical processes in crops, such as photosynthetic pigment ratio, strengthening of the antioxidant system, improved root growth, and greater nutrient use efficiency (NUE). Furthermore, biostimulants have the capacity to alter primary and secondary metabolism pathways of plants, which enhances yields in a short period of time and in a cost-effective manner [6]. These characteristics have led to the application of biostimulants in intensive agricultural systems, which could reduce the use of fertilizers without affecting crop quality and yield. Currently, biostimulants are being used in open field systems, as

bioestimulantes se están utilizando en los sistemas de cultivo a campo abierto, así como en sistemas intensivos bajo condiciones de invernadero, y se aplican tanto en frutales como en hortalizas, plantas ornamentales, cereales, berries y césped [1].

En el cuadro 2 se presentan ejemplos del uso de los bioestimulantes para mejorar las características fisiológicas de las plantas, el rendimiento, la tolerancia al estrés abiótico, la eficiencia en el uso de los nutrimentos y la calidad de los cultivos.

well as in intensive ones under greenhouse conditions, besides being also applied in fruit trees, vegetable, ornamental plants, cereals, berries, and grass [1]. Examples of the use of biostimulants to improve plant physiological characteristics, yield, abiotic stress tolerance, nutrient use efficiency, and crop quality are presented in Table 2.

Cuadro 2. Bioestimulantes vegetales y su efecto en la producción de cultivos.

Table 2. Plant biostimulants and their effect on crop production.

Característica	Tipo de bioestimulante	Cultivo	Efecto	Referencia
Fisiología de los cultivos	Hidrolizado de alfalfa, quitosano	Fresa	Mayor acumulación de biomasa en raíces, frutos y mayor área foliar	11
	Extractos de <i>A. nodosum</i>	A. Maíz	Mayor crecimiento, efecto en el metabolismo secundario y lípidos	12
	<i>A. chroococcum</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>megatherium</i>	B. Maíz	Mayor contenido de clorofila, tasa fotosintética y tasa de transpiración	10
Rendimiento	<i>Glomus intraradices</i>	Calabacín	Mayor rendimiento comerciable y reducción de las emisiones de CO ₂	13
	Quitosano, silicio Aminoácidos, extractos de algas	Fresa Frijol	Mayor rendimiento de frutos Mayor rendimiento de grano	11 9
Tolerancia al estrés abiótico	Hidrolizados de proteínas vegetales	Tomate	Mayor transpiración, conductancia estomática y tolerancia al estrés oxidativo bajo limitación de agua	8
	Ácidos fúlvicos + <i>A. nodosum</i>	A. Soya	Mayor tasa fotosintética y actividad de las enzimas antioxidantes bajo déficit hídrico	14
	<i>F. mosseae</i> , <i>lamellosum</i>	C. Lechuga	Mejor crecimiento, mayor contenido relativo de agua y mejor relación K/Na bajo estrés salino	15
Eficiencia en el uso de nutrimentos	<i>Trichoderma</i>	Lechuga y rúcula	Mayor contenido de ácido ascórbico, absorción y eficiencia en el uso del N	16
	Extractos de <i>A. nodosum</i>	A. Maíz	Reubicación eficiente de las reservas internas de P	12
	<i>R. fasciculatus</i> ,	Trigo, tomate	Incremento en la absorción del P, N y K	17
Calidad de los cultivos	Hidrolizado de alfalfa y quitosano	Fresa	Mayor firmeza de fruto y contenido de compuestos fenólicos.	11
	Melatonina	Cereza	Mayor contenido de sólidos solubles, flavanoles, antocianinas	18
	Aminoácidos, extractos de algas	Frijol	Mayor contenido de proteína, fibra, fenólicos, flavonoides, antocianinas	9

Los bioestimulantes han recibido una atención notable en los últimos tiempos, entre otras cosas, debido al cambio

Biostimulants have received a notable attention in the last years, among other things. Due to climate change,

climático y cada vez más se están utilizando en la agricultura y en los sistemas de producción como promotores del crecimiento, el rendimiento de las plantas, la calidad de los cultivos y como elicitores previos al estrés [7]. No obstante, se carece de investigación fundamental sobre los mecanismos de acción de muchos productos con actividad bioestimulante, por lo que se requiere de generar y subsanar las deficiencias en el conocimiento por parte de la comunidad científica. Es necesario entender y elucidar las bases biológicas del funcionamiento de los bioestimulantes bajo diferentes ambientes y estrategias de manejo, así como conocer los mecanismos de acción a nivel fisiológico, bioquímico, celular y molecular para fortalecer el desarrollo de una industria de bioestimulantes con base científica, con la finalidad de hacer una aplicación eficaz y segura en la agricultura para mejorar la salud y la resistencia de los cultivos ante un clima desafiante [19].

Por lo que la comprensión de la función agrícola de los bioestimulantes y el entendimiento de sus mecanismos de acción permitirán el desarrollo de una segunda generación de bioestimulantes vegetales, diseñados para que funcionalmente actúen en sinergia y mediante mecanismos complementarios [3].

they have been used each time more in agriculture and in production systems as growth promoters, plant yield, crop quality, and as elicitors previous to stress [7]. Nonetheless, fundamental research is lacking on the mechanisms of action of many products with biostimulant activity, thus the need to generate and address the knowledge gap in the scientific community. Understanding and elucidating the biological bases of biostimulant functioning are necessary under different environments and management strategies. Also important is to know the mechanisms of action at physiological, biochemical, cellular and molecular levels to strengthen biostimulant industry development with scientific bases to make an efficient and safe application in agriculture and to improve health and crop resistance facing a challenging climate [19].

Therefore, understanding the agricultural function of biostimulants and their mechanisms of action should allow the development of a second generation of plant biostimulants, designed to act functionally in synergy and through complementary mechanisms [3].

Referencias References

1. Roupael Y, Colla G (2020a) Toward a sustainable agriculture through plant biostimulants: from experimental data to practical applications. *Agronomy* 10:1461
2. Hamedani SR, Roupael Y, Colla G, *et al.* (2020) Biostimulants as a tool for improving environmental sustainability of greenhouse vegetable crops. *Sustainability* 12:510
3. Roupael Y, Colla G (2020b) Editorial: Biostimulants in agriculture. *Front Plant Sci* 11:40
4. Du Jardin P (2015) Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci Hortic* 196:3-14
5. Drobek M, Frac M, Cybulska J (2019) Plant Biostimulants: importance of the quality and yield of horticultural crops and the improvement of plant tolerance to abiotic Stress—A review. *Agronomy* 9:335
6. Malik A, Mor VS, Tokas J, *et al.* (2021) Biostimulant-treated seedlings under sustainable agriculture: A global perspective facing climate change. *Agronomy* 11:14
7. García-Gaytán V, Hernández-Mendoza F, Coria-Téllez AV, *et al.* (2018) Fertigation: Nutrition, stimulation and bioprotection of the root in high performance. *Plants* 7:88
8. Paul K, Sorrentino M, Lucini L, *et al.* (2019) A combined phenotypic and metabolomic approach for elucidating the biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate on tomato grown under limited water availability. *Front Plant Sci* 10:493
9. Kocira S, Szparaga A, Hara P, *et al.* (2020) Biochemical and economical effect of application biostimulants containing seaweed extracts and amino acids as an element of agroecological management of bean cultivation. *Sci Rep* 10:17759

10. Efthimiadou A, Katsenios N, Chanioti S, *et al.* (2020) Effect of foliar and soil application of plant growth promoting bacteria on growth, physiology, yield and seed quality of maize under Mediterranean conditions. *Sci Rep* 10:21060
11. Soppelsa S, Kelderer M, Casera C, *et al.* (2019) Foliar applications of biostimulants promote growth, yield and fruit quality of strawberry plants grown under nutrient limitation. *Agronomy* 9:483
12. Shukla PS, Prithviraj B (2021) *Ascophyllum nodosum* biostimulant improves the growth of *Zea mays* grown under phosphorus impoverished conditions. *Front Plant Sci* 11:601843
13. Hamedani SR, Rouphael Y, Colla G *et al.* (2020) Biostimulants as a Tool for Improving Environmental Sustainability of Greenhouse Vegetable Crops, *Sustainability* 12:5101
14. Rosa V do R, Dos Santos ALF, da Silva AA, *et al.* (2021) Increased soybean tolerance to water deficiency through biostimulant based on fulvic acids and *Ascophyllum nodosum* (L.) seaweed extract. *Plant Physiol Biochem* 158:228-243
15. Santander C, Aroca R, Cartes P (2021) Aquaporins and cation transporters are differentially regulated by two arbuscular mycorrhizal fungi strains in lettuce cultivars growing under salinity conditions. *Plant Physiol Biochem* 158:396-409
16. Fiorentino N, Ventrino V, Woo SL, *et al.* (2018) *Trichoderma*-based biostimulants modulate rhizosphere microbial populations and improve N uptake efficiency, yield, and nutritional quality of leafy vegetables. *Front Plant Sci* 9:743
17. Chandrasekaran M (2020) A meta-analytical approach on arbuscular mycorrhizal fungi inoculation efficiency on plant growth and nutrient uptake. *Agriculture* 10:370
18. Xia H, She Y, Shen T, *et al.* (2020) Melatonin accumulation in sweet cherry and its influence on fruit quality and antioxidant properties. *Molecules* 25:753
19. Nephali L, Piater LA, Dubery IA, *et al.* (2020) Biostimulants for plant growth and mitigation of abiotic stresses: a metabolomics perspective. *Metabolites* 10:505

Capítulo III

Semillas Sintéticas Producidas en Laboratorio

Synthetic Seeds Produced in a Laboratory

Antonia Gutiérrez Mora^{1*} Cristopher Saúl Flores Ramírez²

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México, CP 45019. ²Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias-Estudiante. *Autor correspondencia: agutierrez@ciatej.mx

Introducción

Las semillas sostienen y protegen la vida, proporcionan alimento a la humanidad, animales y otros seres vivos, son la materia prima para la gran cantidad de productos empleados por el hombre, son riqueza y el futuro germen de una nueva generación. En la actualidad, la agricultura tradicional enfrenta problemas, tales como la baja posibilidad de germinación en las semillas de ciertas especies, principalmente, aquellas plantas que tienen alto interés económico en el área ornamental, forestal y forrajera, contemplando aspectos como: la dormancia, latencia, baja tasa de viabilidad del polen, esterilidad de la flor, entre otros aspectos.

Por otro lado, el resultado de una polinización y la fecundación es la formación de una semilla, sin embargo, es necesario conocer qué caracteriza a una semilla. La semilla contiene reservas suficientes de nutrientes y tiene la capacidad de absorber el agua, ambas funciones darán lugar a la germinación de la planta, logrando que emerja la raíz; después empieza a desarrollarse el tallo, aparecen los cotiledones y se forma la plántula.

Se han desarrollado alternativas para la propagación vegetal, tal es el caso de la propagación *in vitro*, utilizando diferentes métodos como la organogénesis, proliferación de yemas axilares y embriogénesis somática.

La embriogénesis somática (asexual o adventicia), consiste en el desarrollo de embriones a partir de células que no son el producto de una fusión gamética; es un proceso por el cual se produce una estructura bipolar (embrión) a partir de una célula somática. Los primeros en obtener y desarrollar embriones somáticos fueron Steward *et al.* [1] en el año 1958 en tejidos de zanahoria. A esta especie modelo se han añadido más de 50 especies; alfalfa y leñosas forestales se multiplican comercialmente en la actualidad por este método.

La embriogénesis somática como sistema de propagación de plantas presenta una serie de ventajas frente a otros sistemas. Esta técnica permite obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz.

Introduction

Seeds sustain and protect life, provide food to humanity, animals, and other living beings. They are the raw matter for many products used for humans; they are rich and the future germ of a new generation. Currently, traditional agriculture confronts problems, such as the low possibility of seed germination of certain species, mainly plants with a high economic interest in ornamental, forestal, and foraging areas. Thus, some aspects have been contemplated, such as dormancy, latency, low pollen viability rate, flower infertility, among others.

On the other hand, the result of pollination and double fertilization is known as seed development. However, it is essential to know what characterizes a seed. The seed contains sufficient nutrient reserves and it can absorb the water. Both functions give rise to plant germination achieving root emergence; then, the stem starts to develop, cotyledons appear, and the seedling is formed.

Alternatives have been developed for plant propagation. Such is *in vitro* propagation, utilizing different methods, for example, organogenesis, axillary bud proliferation, and somatic embryogenesis.

Somatic embryogenesis (asexual or adventitious) consists of embryo development starting from cells that are not the product of a gamete fusion; it is a process by which a bipolar structure is produced (embryo) starting from a somatic cell. The first researchers in obtaining and developing somatic embryos were Steward *et al.* [1] in 1958, in carrot tissues. To this species model more than 50 species have been added; alfalfa and woody forestry species, some of them have currently multiplied commercially by this method.

Somatic embryogenesis -as a plant propagation system- shows a series of advantages facing other systems. This technique allows obtaining complete structures with apex and root in one single process.

Por otro lado, el concepto de "semilla sintética" hace referencia a arquitecturas vegetales de origen asexual o somático (embrión somático), que se encapsulan en un "endospermo artificial" (formado por alginato de sodio y cloruro de calcio).

Esta semilla se diferencia de la semilla verdadera en que el embrión es somático y no cigótico y que tiene endospermo y cubierta artificial. Esta semilla, puesta en condiciones adecuadas, germina y se convierte en una planta. Diferentes grupos de investigación han contribuido al desarrollo de las semillas sintéticas. Entre ellos se deben destacar el grupo liderado por Keith Walker de la Compañía Monsanto que a partir de mediados de la década del 70 trabajaron especialmente con alfalfa. Igualmente, Lawrence [2] de la Union Carbide y colaboradores iniciaron los trabajos con especies forestales, lechuga y apio. Otros investigadores como Janick *et al.* [3] realizaron sus trabajos con zanahoria.

La semilla sintética constituye una técnica promisoriosa, que puede ser aplicada en la propagación de plantas que no producen semillas, o poliploides con características élite y líneas vegetales con problemas de propagación [4].

La tecnología de semilla sintética puede tener un impacto significativo en la producción de cultivos, tanto en los de propagación vegetativa como en los que se propagan por semilla, permite la siembra directa de variedades clonadas y puede proveer un medio para el mantenimiento de germoplasma o producción comercial de líneas élite.

Las ventajas del uso de la semilla artificial, incluyen la facilidad de manipulación, transportación y almacenamiento; alto potencial para el escalamiento y bajos costos de producción y subsecuente propagación [5]. En muchos sentidos el protocolo para la producción de semilla sintética imita el desarrollo cigótico, la producción de semilla, y la siembra en campo, lo cual no es sorprendente, ya que el objetivo de la tecnología es producir análogos de semillas naturales [1]. En el Cuadro 1, se describen las diferencias entre la semillas sintéticas y semillas naturales.

On the other hand, the concept of "synthetic seed" refers to plant architecture of asexual or somatic (embryo) origin, which is encapsulated in an "artificial endosperm" (formed by sodium alginate and calcium chloride).

This seed is different from the natural seed in that the embryo is somatic and not zygotic and that it has artificial endosperm and covering. This seed, placed under suitable conditions, germinates and turns into a plant. Different research groups had contributed to synthetic seed development, among which the group led by Keith Walker of the Monsanto Company stood out when they worked primarily with alfalfa from the mid-1970s. Likewise, Lawrence (1981) [2] of the Carbide Union started working with forest species, lettuce, and celery. Other researchers as Janick *et al.* [3] performed their works with carrots.

The synthetic seed constitutes a promising technique, which may be applied in the propagation of plants that do not produce seeds or polyploids with elite characteristics and plant lines with propagation problems [4]. Synthetic seed technology may significantly impact crop production, both in plant and seed propagation, allowing direct sowing of cloned varieties and may provide a medium for germplasm maintenance or commercial elite line production.

The advantages of using artificial seeds include that they are easy to manipulate, transport, and store; they have a high potential for scaling-up, low production costs, and subsequent propagation [5]. In many ways, the protocol for synthetic seed production imitates zygotic development, seed production, and field sowing, which is not surprising since the objective of technology is to produce natural seed analogs [1]. Table 1 describes the differences between synthetic and natural seeds.

Cuadro 1. Diferencias entre semillas sintéticas (embriones somáticos encapsulados) y semillas naturales (embriones cigóticos).

Table 1. Differences between synthetic seeds (somatic encapsulated embryos) and natural seeds (zygotic embryos).

SEMILLA SINTÉTICA	SEMILLA NATURAL
Endospermo compuesto por alginato de sodio y cloruro de calcio.	Endoespermo compuesto de moléculas de origen biológico, aportados por su progenitor, rico en azúcares, lípidos y proteínas.
Embrión somático producido por embriogénesis somática.	Embrión cigótico, fruto de la polinización y fecundación.
Se usa primordialmente en especies de interés ornamental, forestal o forrajero.	Engloba a todas las especies de plantas.

Clasificación de semillas sintéticas:

Las semillas sintéticas se clasifican en cinco categorías:

- 1) Semillas sintéticas con embriones desecados sin cubierta: En este caso los embriones no están provistos de ningún tipo de cubierta protectora.
- 2) Semillas sintéticas con embriones somáticos desecados y provistos de cubierta protectora: Son recubiertos con polyoxietileno y luego desecados.
- 3) Semillas sintéticas con embriones hidratados sin cubierta: Es el sistema más simple, consiste en utilizar los embriones somáticos tal como resultan del proceso de la embriogénesis somática sin ningún tipo de cubierta protectora.
- 4) Semillas sintéticas con embriones somáticos hidratados suspendidos en un gel viscoso ("fluid drilling").
- 5) Semillas sintéticas con embriones somáticos hidratados y provistos de una cubierta protectora: Tiene la ventaja de que los embriones no están sujetos a la desecación que constituye la principal causa de los bajos valores de conversión en plantas.

En la Figura 1 se mencionan los tipos y algunas características que destacan la importancia de encapsular embriones para la posterior producción de plantas.

El proceso de fabricación de semillas sintéticas pasa por las siguientes etapas: (1) **Inducción de la embriogénesis somática**. Como se mencionó anteriormente es necesario contar con un sistema de producción de embriones somáticos de calidad, y esto se logra mediante la combinación de reguladores de crecimiento en medios de cultivo específicos para cada especie; (2) **Obtención y selección de los embriones somáticos (ES) maduros**. Una vez que se cuenta con el procedimiento para la obtención de los embriones somáticos es necesario seleccionarlos de acuerdo al grado de madurez y que no presenten embriogénesis somática secundaria, libres de callo en raíz y cotiledones. (3) **Sincronización del**

Synthetic seed classification

Synthetic seeds are classified into five categories:

- 1) Desiccated embryos without covering. In this case, the embryos are not provided with any protective cover.
- 2) Desiccated somatic embryos are provided with a protective cover: They are coated with polyoxyethylene and then desiccated.
- 3) Hydrated embryos without covering. This system is straightforward. It consists of utilizing somatic embryos, such as those that result from somatic embryogenesis without any type of protective cover.
- 4) Hydrated somatic embryos suspended in a viscous gel ("fluid drilling").
- 5) Hydrated somatic embryos provided with a protective cover. They have the advantage that embryos are not subjected to desiccation, which constitutes the main cause of low conversion values in plants.

In Figure 1 Description of some characteristics that stand out in the importance of encapsulating embryos for subsequent plant production.

The manufacturing process of synthetic seeds passes through the following four stages: (1) **Induction of somatic embryogenesis**. As mentioned previously, a quality somatic embryo production system is necessary. It can be achieved by combining growth regulators in a specific culture medium for each species; (2) **Obtention and selection of mature somatic embryos (SE)**. Once having the procedure to obtain the somatic embryos, the necessary selection is performed according to their maturity degree without showing secondary somatic embryogenesis, callus-free in root and cotyledons; (3) **Synchronization of somatic embryo growth**. A high

crecimiento de los embriones somáticos. Es necesario que presenten alto porcentaje de germinación y esta debe ser sincronizada, esto es que todos los embriones tengan mismo grado de madurez para que todos desarrollen la plántula en el mismo momento, de preferencia en estado cotiledonar; (4) **Encapsulación y recubrimiento mecánico de los embriones somáticos.** La cubierta que encapsule al embrión no solo debe proteger de daños físicos, sino que también debe permitir el paso de nutrientes y reguladores de crecimiento para inducir la germinación y desarrollo de la planta. Para la encapsulación, se utiliza alginato de sodio, alginato de calcio, alginato de potasio, carragenina, alginato de sodio con gelatina, entre otros. El alginato de sodio es el más utilizado ya que permite la formación de una estructura tridimensional que permite el libre intercambio de agua y nutrientes y es susceptible de albergar compuestos necesarios para la germinación de la semilla.

germination percentage is essential and should be synchronized, which means that all the embryos must have the same maturity degree. They develop the seedling simultaneously, preferably in the cotyledonary stage, and (4) **Encapsulation and mechanical coating of somatic embryos.** The covering that encapsulates the embryo should protect it from physical damage and allow the passage of nutrients and growth regulators to induce plant germination and development. For encapsulation, sodium, calcium, and potassium alginate, carrageen, and sodium alginate with gelatin are used, among others. Sodium alginate is the most used since it allows the formation of a tridimensional structure and free water and nutrient exchange. It is susceptible to host the necessary compounds for seed germination.

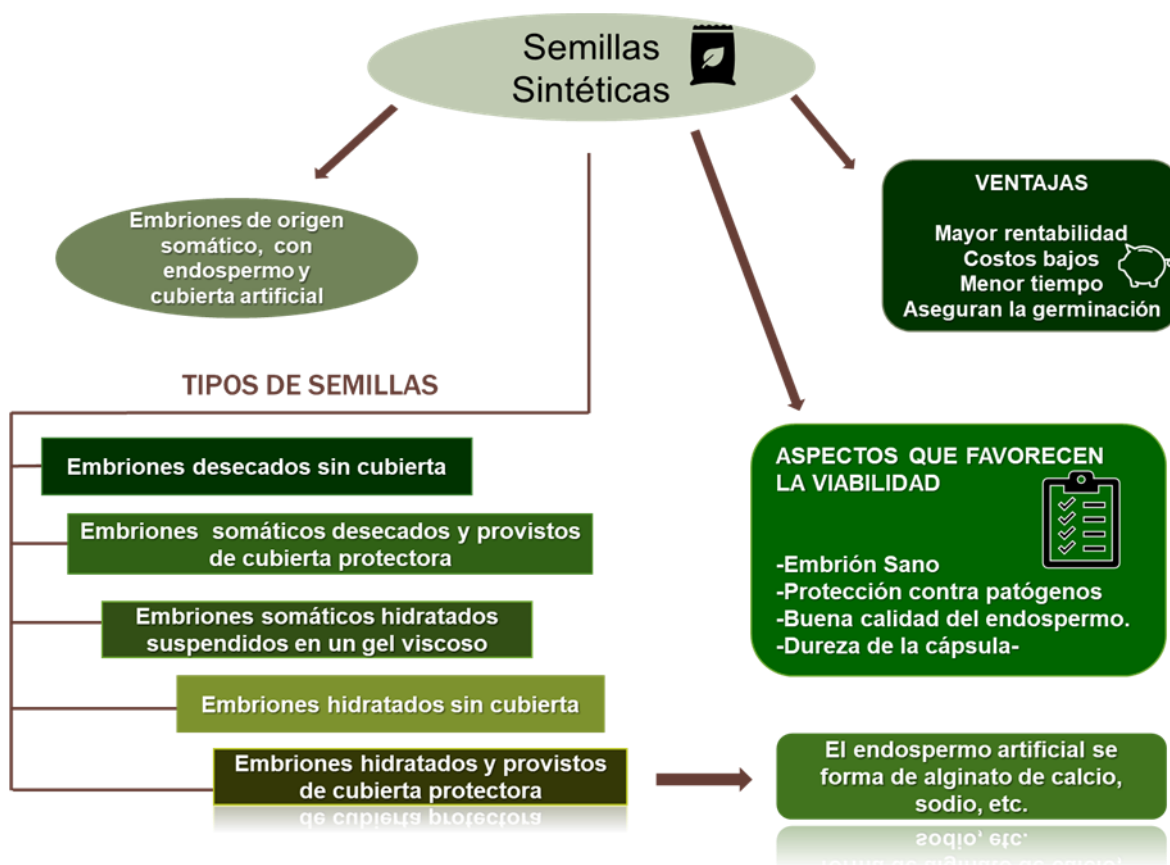


Figura 1. Características, tipos y ventajas de semillas sintéticas
Figure 1. Synthetic seed characteristics, types and advantages

Además del encapsulamiento, un factor importante es el periodo de almacenamiento y el efecto de la temperatura; embriones encapsulados de *Santalum album* almacenados durante 45 días a 4 °C en el medio Murashige-Skoog, (MS) [6] y embriones de *Medicago sativa*, madurados en ácido

Besides encapsulation, a critical factor is the period of storage and temperature. *Santalum album* encapsulated embryos were stored for 45 days at 4 °C in Murashige-Skoog (MS) medium [6], and *Medicago sativa* embryos were matured in abscisic acid and

abscísico y almacenados a esta misma temperatura durante dos meses, no presentaron pérdida de viabilidad; estos factores son importantes para tener una buena germinación [7].

En la actualidad, embriones de muchas especies de interés comercial y ornamental han sido encapsulados con éxito, por mencionar algunas: alfalfa (*Medicago sativa*), [8]. papa (*Solanum tuberosum*) [9], agaves mezcaleros (*Agave angustifolia*), [10] manzana (*Malus spp*), guayaba (*Psidium guajava*) y mango (*Mangifera indica*) [11]. Con respecto a especies ornamentales, se puede mencionar el encapsulamiento de embriones de camelia (*Camellia japónica*) [12], orquídeas del género *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. En la figura 2 se muestra embriones somáticos encapsulados de la especie *L. anceps* ssp. *dawsonii* [13].

stored at the same temperature for two months without detecting loss of viability; these factors were reported to be essential for good germination [7].

Currently, embryos of many species of commercial and ornamental interest have been successfully encapsulated, to mention some: alfalfa (*Medicago sativa*), [8]; potato (*Solanum tuberosum*) [9]; mezcalt agave (*Agave angustifolia*) [10]; apple (*Malus spp*); guava (*Psidium guajava*); and mango (*Mangifera indica*) [11]. Concerning encapsulation of ornamental embryo species, some of them are camelia (*Camellia japónica*) [12]; orchids of the genus *Laelia anceps* ssp. *Dawsonii*. Figure 2 shows encapsulated embryos of the species *L. anceps* ssp. *dawsonii* [13].

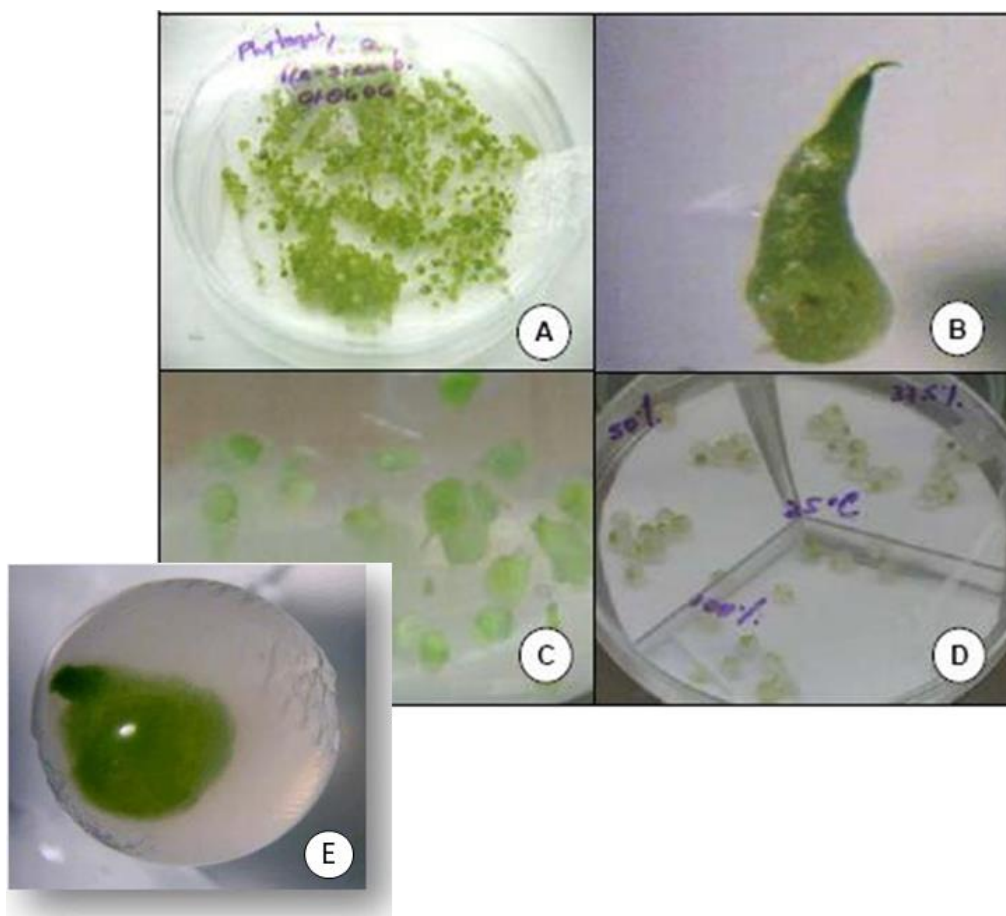


Figura 2. Encapsulación de embriones somáticos de *Laelia anceps* ssp. *Dawsonii*. A. Embriones somáticos. B. Embrión somático en estado plúmula. C. Embriones somáticos suspendidos en cloruro de calcio. D. Semillas sintéticas de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. [13].

Figure 2. Encapsulation of somatic embryos of *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. (A) Somatic embryos; (B) Somatic embryo in plumule stage; (C) Somatic embryos suspended in calcium chloride; (D) Synthetic *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* seeds [13].

La tecnología de encapsulación para la producción de semillas sintéticas permite una mayor versatilidad para la manipulación y el intercambio del germoplasma, ofrece

Encapsulation technology for synthetic seed production allows greater versatility for manipulating and exchanging germplasm. It offers alternatives to

alternativas para cubrir la demanda de recursos genéticos, debido a que se puede aumentar la probabilidad de conversión de embriones somáticos a plantas y por lo tanto incrementar la producción de especies agrícolas que hasta hoy se ven limitadas por problemas de propagación.

cover the demand for genetic resources because the probability of somatic embryo conversion to plants may increase and thus increase the production of agricultural species that have been limited by propagation problems.

Referencias References

1. Steward FC, Mapes MO, Mears K (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells, *Am. J. Bot.*, 45:705-708.
2. Lawrence, Jr., RH (1981) In vitro plant cloning systems. *Reinar. Expt. Bot.* 21:289–300.
3. Janick J, Kitto SL, Kim YH (1989). Production of synthetic seed by desiccation and encapsulation *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 25:1167-1172.
4. Redenbaugh K (1993). Synseeds: application of synthetic seeds to crop improvement. Primera ed. CRC Press, Inc. (Ed). Corporate Blvd., Boca Raton, Florida, Estados Unidos de Norteamérica. 129 p.
5. Ganapathi TR, Srinivias L, Suprasanna P, et la. (2001). Regeneration of plants from alginate-encapsulated somatic embryos of banana cv. Rasthali (*Musa SPP.* AAB Group). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37:178-181.
6. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-97.
7. Bapat VA, Rao PS (1988). Sandalwood plantlets from 'Synthetic seeds'. *Plant Cell Rep.* 7:434-436.
8. McKersie B, Brown D (1996). Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. *Seed Sci, Res.* 6:109-126.
9. Rodríguez I (2000). Producción de semillas artificiales de microestacas de papa (*Solanum tuberosum*). Cartago, CR. ITCR. 35 p.
10. Arzate-Fernández MA, Piña-Escutia JL, Norman-Mondragón TH, et la. (2016). Regeneración de agave mezcalero (*Agave angustifolia HAW.*) a partir de embriones somáticos encapsulados. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 39:359 -366.
11. Rai MK., Asthana SK., Singh VS., Jaiswal U. (2009). The encapsulation technology in fruit plants – a review. *Biotechnol. Adv.* 27:671-679.
12. Lee-Espinosa HE, Murguía-González J, Laguna-Cerda A, et al. (2009). Encapsulación de embriones somáticos de *Laelia anceps ssp. dawsonii* para la producción de semilla sintética. *Rev. Chap. Serie Hort.* 15:33-40.
13. Janeiro LV, Ballester A, Vieitez AM (1997). In vitro response of encapsulated somatic embryos of camellia. *Plant, Cell Tiss. Org. Cult.* 51:119-125.

Capítulo IV

Los Sistemas de Inmersión Temporal una Alternativa Para la Micropropagación

Temporal Immersion Systems an Alternative for Micropropagation

José Juvencio Castañeda-Nava^{1*}, Estefania Lazcano Diaz¹

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México, CP 45019. *Autor correspondencia: jcastaneda@ciatej.mx

Introducción

El uso de técnicas de cultivo de tejidos vegetales (CTV) se ha convertido en la actualidad una alternativa de propagación debido a las ventajas que presenta con respecto a las técnicas tradicionales, el CTV permite tener plantas libres de microorganismo, homogeneidad genética cuando así se requiere, obtener plántulas completas de cualquier órgano de la planta, además de ser una herramienta para el mejoramiento genético, todo esto se debe a la totipotencia de las células vegetales [1].

Dentro de las técnicas CTV se pueden encontrar la proliferación de yemas axilares que es el método más utilizado por presentar alta producción, las plantas se mantienen uniformes sin variación somaclonal que en algunos tipos de cultivo es necesario mantener. La proliferación de yemas axilares consiste en eliminar la dominancia apical dada por las auxinas, al adicionar al medio de cultivo citocininas estimula las yemas axilares por presentar mayor cantidad de citocininas que de auxinas [2]. El cultivo de meristemos apicales es una alternativa para la producción de plantas libres de virus debido a que los virus no pueden llegar hasta el meristemo apical porque carece de vasos de conducción, en esta técnica se obtiene el domo del meristemo apical con la ayuda de un estereoscopio y es colocado en un medio de cultivo que generalmente presenta como reguladores de crecimiento auxinas y en algunos casos giberelinas para que se elonguen los tallos y posteriormente estos se multiplican por medio de proliferación de yemas axilares. En la organogénesis se produce cualquier tipo de órgano como raíz u hoja, pero no una planta completa, esta puede ocurrir por dos vías directa e indirecta. La organogénesis directa es la formación de órganos a partir de células competentes y determinadas para este fin, o por medio de estímulos de reguladores de crecimiento [3]. La organogénesis indirecta consiste en la dediferenciación de órgano o tejidos obteniendo una masa de células (callos) esto ocurre por la adición al medio de cultivo reguladores de crecimiento generalmente ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) que pertenece al grupo de las auxinas, los callos se pueden dar origen a brotes, raíces, hojas o algún otro órgano, la diferenciación en un órgano u otro puede variar para cada tipo de planta esto depende de

Introduction

The use of plant tissue culture (PTC) techniques has turned out to be a propagation alternative because of their advantages with respect to the traditional ones. PTC allows having plants free of microorganisms, genetic homogeneity when required, obtaining complete seedlings from any plant organ besides being a genetic improvement tool. All of the previous is possible because of totipotent plant cells [1].

Axillary bud proliferation is found within the PTC techniques. It is the most used method for showing high production and maintaining plants uniform without somaclonal variation, which in some types of crops is necessary. This approach consists of eliminating the given apical dominance by auxins by adding cytochinins to the culture medium to stimulate axillary buds showing a greater amount of cytochinins than auxins [2]. Apical meristem culture is an alternative for free-virus plant production because viruses cannot reach the apical meristem due to the lack of conduction vessels. With this technique, the apical meristem dome is obtained with a stereoscope and placed in a culture medium that generally shows auxins as growth regulators, and in some cases gibberellins, so stems can elongate. Subsequently, they multiply by means of axillary bud proliferation. Any type of organ, such as root or leaf may be produced in organogenesis but not a complete plant, which may occur by two direct and indirect ways. Direct organogenesis is the formation of organs starting from competent and determinant cells for this purpose or by means of stimuli from growth regulators [3]. Indirect organogenesis consists of dedifferentiation of the organ or tissues obtaining a mass of cells (callus), which occurs by adding growth regulators to the culture medium, generally 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) acid that belongs to the auxin group. Callus may originate shoots, roots, leaves or any other organ. Differentiation in an organ or another one may vary for each type of plants, which depends on endogenous tissue conditions and the growth regulator added [4]. Somatic embryogenesis occurs naturally; some plants

las condiciones endógenas de los tejidos y del regulador de crecimiento que se adicione [4]. La embriogénesis somática ocurre de manera natural, algunas plantas tienen tendencias de poliembriogénesis, esto ocurre en la fertilización cigótica el embrión se divide en dos o más embriones, también algunas hojas de las plantas generan embriones [2]. *In vitro* la embriogénesis, somática puede ser en dos vías directa o indirecta. Aunque existe aun controversia si el origen de los embriones somáticos es unicelular o pluricelular, esta técnica es utilizada en la transformación genética. La embriogénesis somática presenta variaciones genéticas que puede ser una desventaja para algunos cultivos que se quiera mantener estables sus características o puede ser una ventaja cuando se busca variación, debido a que las células están en división celular acelerada, de igual manera los tejidos que dan origen de los embriones pueden ser diferente debido a la influencia de los factores abióticos [1]. La recuperación de embriones cigóticos inmaduros de frutos o semillas se utiliza en las cruces interespecíficas o que no existe compatibilidad entre los progenitores y el endospermo no se forma, los embriones se toman de las semillas y se colocan en los medios de cultivo estos germinan y se desarrollan completamente, esta técnica se conoce como rescate de embriones.

El CTV que se realiza en medios semisólidos las ventajas que presenta son que el material vegetativo es fácil de observar y recuperar, además las plántulas o brotes conservan la misma orientación en todo el cultivo, por lo cual se obtienen brotes y raíces de forma más ordenada, y en el cultivo de callos las células no se desprenden. Los inconvenientes al utilizar medios sólidos algunos solidificantes contienen inhibidores de sustancias que pueden reducir las tasas de crecimiento, las plantas presentan exudados tóxicos y no se difunden con rapidez, cuando las plántulas se retiran de los contenedores para la aclimatación se tiene que lavar las raíces para desprender todo el medio de cultivo para prevenir el desarrollo de microorganismos [4]. Los medios de cultivo líquidos se utilizan para los cultivos en suspensión de callos y órganos, las ventajas de los medios líquidos son que las plantas presentan exudados tóxicos por ser un medio líquido no se acumulan alrededor de los tejidos, cuando las plántulas se retiran de los contenedores no se tiene que hacer varios lavados para desprender todo el medio de cultivo. Las desventajas que presenta el cultivo en medio líquido es que: algunos tejidos que son frágiles se pueden dañar con facilidad por la agitación y el movimiento en el que se encuentran, la multiplicación de brotes se dificulta por que los explantes están totalmente sumergidos en el medio de cultivo y entorpecen el desarrollo, los medios líquidos tienen que estar en movimiento y los tejidos en constante aireación [1]. Además, al estar en los medios líquidos los tejidos presentan problema fisiológico por que muestran hiperhidricidad [5]

have polyembryogenesis tendencies, which occur in cygotic fertilization where the embryo splits in two or more embryos. Some plant leaves may also generate embryos [2]. Somatic embryogenesis *in vitro* may be in two ways, direct or indirect although controversy still exists if the origin of somatic embryos is unicellular or pluricellular. This technique is used in genetic transformation. Somatic embryogenesis shows genetic variations that may be a disadvantage for some crops whose characteristics should be kept stable or an advantage when variety is desired. Because the cells are in accelerated division, in the same manner the tissues that give origin to the embryos may be different because of the influence of abiotic factors [1]. The immature cygotic fruit or seed embryo is used in interspecific crossbreeds or when no compatibility exists between progenitors and the endosperm is not formed. The embryos are taken from the seeds and placed in the culture medium. They germinate and develop completely. This technique is known as embryo rescue.

The advantages of PTC performed in semisolid media are that plant material is easy to observe and recover. Additionally, seedlings or shoots conserve the same direction in all the culture, which is why shoots and roots are obtained more orderly, and in the callus culture, the cells do not detach. The inconveniences in using solid media are that some solidifiers contain substance inhibitors that may reduce growth ratio, the plants show toxic exudates and do not propagate rapidly. When seedlings are removed from the containers for acclimation, their roots have to be washed to remove all the culture media to prevent development of microorganisms [4]. On the other hand, liquid culture media are used for callus and organ suspension cultures. The advantages liquid medium are that plants show toxic exudates do not accumulate around the tissues. When seedlings are removed from the containers there is no need of washing them several times to remove all the culture medium. The disadvantages of liquid media are that some fragile tissues may be damaged easily by agitation and movement in which they are found; shoot multiplication is difficult because the explants are totally submerged in the culture media, which hinders development; liquid media have to be in movement and tissues in constant aeration [1]. Furthermore, because tissues are in liquid media, they show physiological problems as hyperhydricity [5].

Nowadays, different containers intend to improve and make liquid medium culture efficient to avoid explants and tissues remaining totally submerged in the media (Table 1), so they only have contact with it in very short periods. This type of technique is called temporal

Actualmente existen diferentes contenedores que pretenden mejorar y hacer eficientes los cultivos en medio líquido evitando que los explantes o tejidos permanezcan totalmente sumergidos en el medio (Cuadro 1), sólo teniendo contacto en periodos muy cortos con el medio de cultivo, a este tipo de técnica se le llama Sistema de Inmersión Temporal (SIT) [6]. Existen 4 diferentes sistemas (SIT) según funcionamiento: máquinas de inclinación y balanceo; inmersión completa con la renovación del medio nutritivo; inmersión parcial con un mecanismo de renovación de nutrientes; inmersión completa y sin renovación del medio nutritivo. Las técnicas más empleadas de CTV en los sistemas de inmersión temporal por sus efectos positivos son: la proliferación de yemas axilares, microtuberización, embriogénesis somática, microtubérculos y en menor medida producción de biomasa para la obtención de metabolitos secundarios. La automatización es uno de los beneficios que presentan los SIT por lo cual la propagación se vuelve más eficiente y reduce la mano de obrar, esto se refleja en los costos de producción. Las plantas que son propagadas en sistemas inmersión temporal mejoran generalmente debido a que presentan un mayor vigor de los brotes y los embriones somáticos son morfológicamente normales, la hiperhidricidad (vitrificación) que afecta gravemente a los cultivos en medio líquido se controla al modificar tiempos de inmersión acorde a las necesidades de las especies. Las plántulas propagadas en SIT pueden presentando menos síntomas de estrés durante la fase de aclimatación que el material obtenido en medios semisólidos o líquidos [7].

El sistema de inmersión temporal (SIT), al combinar los beneficios de la aireación del medio sólido y el contacto completo con medio líquido, ofrece una alternativa viable en la multiplicación *in vitro* [8], ya que proporciona un entorno más natural para el cultivo *in vitro* de plantas. El desarrollo de TIS está estrechamente relacionado con la comercialización de micropropagación de plantas.

El funcionamiento del SIT esta basados en alternancia de ciclos de inmersión del tejido vegetal cultivado en el medio líquido seguido de drenar y exponer el tejido vegetal a un ambiente gaseoso, la inmersión solo suele durar unos cuantos minutos, el tiempo que no está en contacto con el medio de cultivo es mayor que incluso puede ser horas este periodo es muy importante para evitar la hiperhidratación. Previo a la producción a gran escala se tienen que establecer los tiempos de inmersión y frecuencia de exposición lo cual permitirán crear condiciones óptimas de humedad y un suministro de nutrientes con un contacto mínimo necesario con el medio de cultivo [9].

immersion system (TIS) [6]. Four different TIS exist according to their function: tilting and rocker machines; complete immersion with nutrient medium renewal; partial immersion with nutrient renewal mechanism; complete immersion without nutrient medium renewal. Because of positive effects, the most used TIS techniques are axillary bud proliferation, microtuberization, somatic embryogenesis, microtubers, and in a lower measure, biomass production to obtain secondary metabolites. Automation is one of the benefits that TIS shows, so propagation turns out to be more efficient and reduces workforce, which reflects in production costs. The plants propagated in TIS generally improve since they show a greater vigor in shoots and the somatic embryos are morphologically normal; hyperhydricity (vitrification) severely affects crops in liquid culture media, which is controlled by modifying immersion times according to the needs of the species. The seedlings propagated in TIS may show less stress symptoms during the acclimation stage than those obtained in semisolid or liquid systems [7].

By combining the benefits of solid medium aeration and complete contact with liquid medium, TIS offers a viable alternative *in vitro* multiplication [8], since it provides a more natural environment for plant *in vitro* culture.

The TIS operation is based on alternating immersion cycles of the plant tissue cultured in the liquid media, followed by draining and exposing the plant tissue in gaseous environment. Immersion only lasts a couple of minutes, time in which the tissue is not in contact with the culture medium, which is longer and may also be for hours. This period is very important to avoid hyperhydration. Previous to production at large scale, immersion time and frequency of exposure should be established to allow creating the optimum conditions for humidity and nutrient supply with a necessary minimum contact with the culture medium [9].

Cuadro 1. Micropropagación de diferentes especies en Sistemas de Inmersión Temporal.
Table 1. Micropropagation of different species in Temporal Immersion Systems.

Especie	Método de propagación	SIT	FI	TI	Referencia
<i>Liquidambar sp.</i>	Embriogénesis somática	RITA®	1min/12h	45 d	29
<i>Agave angustifolia</i>	Proliferación de yemas axilares	RITA®	1min/6h	30 d	30
<i>Nasturtium officinale</i>	Metabolitos secundarios	RITA®	5min/1.5h	20 d	31
<i>Carica papaya</i>	Embriogénesis somática	RITA®	1min/12h	30 d	32
<i>Cattleya forbesii</i>	Proliferación de yemas axilares	RITA®	1min/4h y 1min/8h	60 d	33
<i>Colocasia esculenta</i>	Proliferación de yemas axilares	TIB	2min/4h	40 d	34
<i>Guarjanthe skinneri</i>	Proliferación de yemas axilares	TIB®	2min/4h	30 d	35
<i>Malus domestica</i>	Proliferación de yemas axilares	TIB	10min/3h	42 d	36
<i>Gerbera jamesonii</i>	Proliferación de yemas axilares	TIB	4min/8h	35 d	37
<i>Stevia rebaudiana</i>	Proliferación de yemas axilares	BIT®	3min/6h	21 d	38
<i>Vanilla planifolia</i>	Proliferación de yemas axilares	BIG	2min/4h	42 d	39

RITA®: Recipient for Automated Temporary Immersion. TIB: Temporary Immersion Bioreactor, BIT: Bioreactor de Inmersión temporal, BIG: Gravity Immersion Bioreactors. SIT: Sistema de Inmersión Temporal. FI: Frecuencia de inmersión. TI: Tiempo de incubación en días

Los tiempos de inmersión utilizados son diferentes en cada trabajo, varían dependiendo de las especies, procesos de micropropagación y sistemas de inmersión temporal que se está utilizando [5]. Otro de los factores a considerar en los SIT se tiene optimizar el volumen del medio cultivo cuando se utilizan SIT sin renovación media, como matraces gemelos y sistemas RITA o máquinas inclinación y balanceos, debido a que los nutrientes se pueden agotar antes de alcanzar el crecimiento esperado. Los volúmenes más altos pueden ser menos eficientes debido a que se puede encontrar en la secreción moléculas químicas que estimulan la formación de brotes, al utilizar grandes volúmenes se diluyen cuando se compara en el mismo SIT, por lo tanto, los mayores volúmenes también pueden llevar a una caída en la tasa de propagación [10]. La asfixia son condiciones fisiológicas indeseables, causado por el bajo contenido de oxígeno, al permanecer periodos prologados al medio gaseoso el tejido vegetal facilita el intercambio de oxígeno a las células, en comparación con los cultivos que se encuentran totalmente sumergidos en los medios de cultivo, [11]. Algunos SIT tienen la opción adicional de enriquecer con CO₂ durante el período de exposición al gas. La humedad relativa resultante de la ventilación forzada puede estimular transpiración en las plantas, esto ayuda para que el proceso adaptación a las condiciones *ex vitro* sea exitoso [12]. El volumen del contenedor en los sistemas de inmersión temporal es mayor en comparación de los contenedores utilizados para cultivos semisólidos, estos pueden ser de volúmenes más grandes de entre 1 a 10 litros. Para que el contenedor sea adecuado para los SIT deberá preferiblemente ser de boca ancha y autoclavable con tapas que se puedan perforar fácilmente para adaptadores conectores para manguera de silicón autoclavable para montar filtros de aire. Los materiales de contenedor pueden ser plástico o vidrio claro y traslúcido.

The immersion times used are different in each work. They vary depending on the species, micropropagation processes and temporal immersion systems used [5]. Other factors to consider in TIS are to optimize the culture medium volume when TIS is used without medium renewal, such as twin flasks and the recipient for automated temporary immersion (RITA®, Vitropic, S.A., MX) or tilter and rocker machines because nutrients may run out before the expected growth is reached. Higher volumes may be less efficient because the chemical molecules found in the secretion stimulate shoot formation, so are diluted when they are greater volumes. Thus, the reason why greater volumes may also lead to a fall in propagation ratio [10]. Asphyxiation is an undesirable physiological condition caused by low oxygen content by remaining for extended periods in gaseous medium. Plant tissue facilitates oxygen exchange to cells compared with crops found totally submerged in culture media [11]. Some TIS have the additional option of enriching with CO₂ during the gas exposure period. The resulting relative humidity of forced ventilation may stimulate transpiration in plants, which helps making the adaptation process to *ex vitro* conditions successful [12]. The container volume in TIS is greater when compared to other containers used for semisolid cultures, which may be of greater volumes from 1 to 10 L. To select the adequate one, it should preferably be with wide mouth and autoclavable with lids that can be perforated easily to connect adaptors for autoclavable silicon hose to assemble air filters. The container materials should be translucent and light plastic or glass.

Para la producción de embriones somáticos se han reportado la utilización de diferentes SIT existiendo variación en los tiempos de inmersión dependiendo de la especie, como es el caso de la palma de aceite para ello se utilizó la producción de callo embriogénico en SIT los autores señalan que esta técnica ha demostrado gran potencial para aumentar la tasa de crecimiento del callo embriogénico, los resultados que reportan con mayor eficiencia son el intervalo de tiempo de inmersión de 3 h durante 3 min. [13]. Para los plátanos (*Musa spp.*) se menciona que la propagación iniciando con meristemos apicales en medio de cultivo sólido es un método lento en comparación de la embriones somáticos de plátano en suspensiones celulares señala que se regeneró el 84.5 % de plantas mediante el uso de biorreactores de inmersión temporal (BIT) y con bajo porcentaje de variación somaclonal (1.55 %) en las plantas evaluadas permitió pensar que el método empleado puede ser utilizado para la propagación comercial de plátano [14]. Para especies forestales la utilización de los sistemas de inmersión temporal representa una mayor ventaja debido a que se ha observado que el peso fresco de tejido embriogénico y la frecuencia de maduración de los embriones somáticos aumentó significativamente cuando fueron cultivados en el BIT en comparación con el cultivo sólido [15].

Para la propagación por yemas axilares en los SIT es uno de los métodos de cultivo más empleados, como es el caso de híbridos de caña y plátano, los autores sugieren un total de tres inmersiones cada 24 h esto permite alcanzar los mejores resultados [16]. En otro trabajo con caña de azúcar para la micropropagación se utilizaron embriones somáticos que se propagaron por yemas axilares en SIT, logrando incrementar el número de plantas obtenidas [17]. En el caso de estevia se han comparado la producción de brotes en tres diferentes sistemas RITA[®], BIT[®] y SETIS[®] los autores sugieren que todos los sistemas de inmersión temporal que evaluaron permiten el escalamiento de la producción de plantas y las plántulas obtenidas son promisorios para la siembra [18]. Para la micropropagación por yemas axilares malanga se reporta una eficiencia en los SIT con tiempo de inmersión de 14 min cada 4 h y un volumen de 15 ml de medio de cultivo por brote, alcanzaron con este método un coeficiente de multiplicación de 10.5 brotes [19]. Para la proliferación de yemas axilares de zarzamoras se ha evaluado diferentes concentraciones de medio de cultivo en los SIT se ha reportado que un volumen de 175 ml es adecuado para propagación masiva de esta especie [10]. Para la micropropagación de árboles por proliferación de yemas axilares en SIT puede utilizarse como una alternativa con posibilidad de automatizar el proceso como es el caso del castaño los autores señalan que el uso de cubos de lana evitó la hiperhidricidad con seis inmersiones por día y aireación adicional de 1 min [20]. Para la micropropagación de *Eucalyptus* utilizando SIT se ha reportado que biorreactor en oscuridad proporcionó un mayor número de brotes y tasa

For somatic embryo production, the use of different TIS have been reported with variation in immersion times depending on the species, as is the case of oil palm. For that purpose, embryogenic callus production was used. The authors point out that this technique has demonstrated a great potential to increase growth rate of the embryogenic callus. The result reported with greater efficiency was immersion time interval of 3 h for 3 min [13]. For banana (*Musa spp.*), propagation was reported to start with apical meristems in solid culture medium, which is a slow method compared with somatic banana embryos in cellular suspensions. The authors pointed out that 84.5% of plants was regenerated by using temporary immersion bioreactor system (TIB) and with low somoclonal variation percentage (1.55 %), which in the plants assessed allowed considering that the methods used may be used for commercial propagation of banana [14]. For forestal species, the use of TIS represents a greater advantage because embryogenic tissue fresh weight and somatic embryo maturation frequency increased significantly when they were cultivated in TIB compared with solid culture [15].

For axillary bud propagation, TIS is one of the most used culture methods, as is the case of sugar cane and banana hybrids. The authors suggest a total of three immersions every 24 h, which allow reaching better results [16]. In another work with sugar cane for micropropagation, somatic embryos were propagated by axillary buds in TIS, increasing the number of plants obtained [17]. In the case of stevia, shoot production has been compared in three different systems RITA[®], BIT[®] y SETIS[®]. The authors suggest that all temporal immersion systems evaluated allowed scaling up production of the plants and seedlings, which are promising for sowing [18]. For malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) micropropagation by axillary buds, efficiency in TIS was reported with a volume of 15 mL of culture media per shoot and immersion time of 14 min each 4 h, reaching a multiplication coefficient of 10.5 shoots with this method [19]. For blackberry proliferation of axillary buds, different culture medium concentrations have been evaluated in TIS, reporting that a volume of 175 ml is adequate for massive propagation of this species [10]. For micropropagation of trees by axillary buds, TIS may be used as an alternative with the possibility of automating the process as is the case with chestnut trees. The authors suggested that the use of wool cubes avoided hyperdricity with six immersions per day and additional aeration of 1 min [20]. For Eucalyptus propagation using TIS, a bioreactor in darkness provided a greater number of shoots and multiplication rate [21]. For *in vitro* multiplication of *Morus alba* in TIS, efficiency for

de multiplicación [21]. Para la multiplicación *in vitro* de *Morus alba* en SIT, se observó una eficiencia para la micropropagación utilizando el tiempo de inmersión de tres minutos cada ocho horas, durante 45 días de cultivo, se obtuvo el mayor número de yemas axilares [22].

Para la producción de microtubérculos en los SIT es una alternativa para realizar una propagación masiva, la ventaja que representa la producción de microtuberculos es que son estructuras de las plantas que no representa problemas para la aclimatación. La producción de microtubérculos comprende dos fases: proliferación y microtuberización las plantas que se propagan en mayor medida por este método es la papa y ñames. En papa (*Solanum tuberosum*) se ha reportado hasta 20 microtubérculos [23]. En otro SIT en matraz de 10 L con 4 L de medio de cultivo y 150 explantes se alcanzó un promedio de 390 microtuberculos [24]. En ñame se ha formado 355 microtubérculos en SIT con un tiempo de inmersión de 15 minutos cada seis horas en 60 mL de medio de cultivo por planta y cuatro renovaciones de medio de cultivo [25]. Los microtuberculos en condiciones de campo alcanzaron mayor producción de tubérculos se duplicó con respecto a los que se generaron a partir de segmentos de tubérculos, esto exhibe que los microtubérculos generados en SIT se pueden cultivar en el campo y utilizar como programa de producción de tubérculos-semillas [26]. Para la producción de otro tipo de tallos modificados como los cormos de gladiola (*Gladiolus* spp) en BIT se reporta la obtención de 34 microcormos, lo cual exhibe que estos sistemas de cultivo es una alternativa viable para la multiplicación masiva de microcormos de gladiola [27].

Para la producción de metabolitos secundarios se ha empleado el SIT tal como se reporta para la especie *Castilleja tenuiflora* los autores reportan la presencia de concentraciones adecuadas de metabolitos secundarios en los brotes generados en el SIT al modifica las concentraciones de Nitrógeno en el medio de cultivo [28] en otro trabajo con *Gynura procumbens* (Lour.) en BIT se logró la producción más alta de flavonoides utilizando la frecuencia de inmersión 15 min cada 12 h en medio MS suplementado con reguladores de crecimiento IAA 2 mg/L, BA 8 mg /L [9].

micropropagation was observed with immersion time of 3 min each 8 h for 45 days of culture, obtaining a greater number of axillary buds [22].

For microtubers, TIS is an alternative to perform massive propagation; the advantage that microtuber production represents is that they are plant structures that have acclimation problems. Microtuber production comprises two stages, proliferation and microtuberization. The plants that propagate in a greater measure by this method are potato (*Solanum tuberosum*) and yam (*Discorea*). In potato, up to 20 microtubers have been reported [23]. In another TIS, an average of 390 microtubers was reached in a 10 L flask with 4 L of culture medium and 150 explants [24]. In yam, 355 microtubers were formed in TIS in 60 mL of culture medium per plant and four culture medium renewal with immersion time of 15 min each six hours [25]. Microtubers in field conditions reached a greater production, with respect to those generated starting from tuber segments. This result showed that microtubers generated with TIS can be cultivated in field using as production program tuber-seeds [26]. For other types of modified stem production, as gladiolus (*Gladiolus* spp) corms, BIT obtained 34 microcorms, which shows that these culture systems are a viable alternative for massive gladiolus microcorm multiplication [27].

For the production of secondary metabolites TIS has been used for the species *Castilleja tenuiflora*. The authors reported the presence of adequate concentrations of secondary metabolites in the shoots generated by modifying nitrogen (N) concentrations in the culture medium [28]. In another work with *Gynura procumbens* (Lour.) in BIT, the highest flavonoid production was achieved using the immersion frequency of 15 min each 12 h in MS supplemented with IAA 2 mg/L, BA 8 mg /L growth regulators [9].

Referencias References

1. Hartmann HT, Kester DE, Davies F, *et al.* (2002) Plant Propagation principles and practices. Seventh Edition. Pag. 879
2. George EF (1993) Plant propagation by tissue culture the technology. Exegetics limited. pp. 189-193.

3. Torres MI, Morales MM, Santacruz-Ruvalcaba F *et al.* (2006) Micropropagación por organogénesis in vitro de Agave tequilana Weber variedad azul. Universidad de Guadalajara CUCBA. pp. 25-26.
4. Dodds H. J. y L. W. Roberts. 1985. Experiments in plant tissue culture second edition. Pag 232
5. Berthouly M, Etienne H (2005) Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In: Hvoslef-Eide AK, Preil W (ed) Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation, Springer, Netherlands. pp. 165-195
6. Watt MP (2012) The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. Afr J Biotechnol 11(76):14025-14035
7. Mehrotra S, Goel M K, Kukreja AK *et al.* (2007) Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. Afr J Biotechnol 6(13):1484-1492.
8. Etienne H, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. PCTOC. 69: 215–231.
9. Pramita AD, Kristanti AN, Sugiharto (2018) Production of biomass and flavonoid of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr shoots culture in temporary immersion system. J Genet Eng Biotechnol 16:639–643.
10. Ayub RA, Neves J, Zanlorensi LA *et al.* (2019) Sucrose concentration and volume of liquid medium on the in vitro growth and development of blackberry cv. Tupy in temporary immersion systems. Cienc Agrotec 43:e007219 <http://dx.doi.org/10.1590/1413-7054201943007219>.
11. Georgiev V, Schumann A, Pavlov A *et al.* (2014) Temporary immersion systems in plant biotechnology. Eng Life Sci 14:607–621.
12. Rocano MN, Villena PG, Peña DF (2017) Evaluación de los sistemas de cultivo semisólido y BIT en la multiplicación in vitro de *Juglans neotrópica*. MASKANA 8(1)103-109.
13. Marbun CLM, Toruan-Mathius N, Reflini (2015) Micropropagation of Embryogenic Callus of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Using Temporary Immersion System. Procedia Chem 14:122–129.
14. Korneva S, Flores J, Santos E *et al.* (2013) Plant regeneration of plantain 'Barraganete' from somatic embryos using a temporary immersion system. Biotechnol Apl 30:267-270.
15. Businge E, Trifonova A, Schneider C *et al.* (2017) Evaluation of a New Temporary Immersion Bioreactor System for Micropropagation of Cultivars of Eucalyptus, Birch and Fir. Forests 8,196; doi:10.3390/f8060196.
16. Posada L, Gómez R, Reyes M (2003) Empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal (RITA) en la propagación de plantas vía organogénesis en caña de azúcar y bananos. Biot Veg 3(1):3-8.
17. Medeiros M, Cabral E, Mota GV *et al.* (2015) In vitro propagation in Temporary Immersion System of sugarcane plants variety 'RB 872552' derived from somatic embryos. Biot Veg 15(3): 187-191.
18. Rosales C, Brenes J, Salas K *et al.* (2018) Micropropagation of *Stevia rebaudiana* in temporary immersion systems as an alternative horticultural production method. Rev Chapingo Ser Hortic 24(1): 69-84. doi: 10.5154/r.rchsh.2017.08.028.
19. Santos A, Cabrera M, Gómez R (2011) Multiplicación en sistema de inmersión temporal del clon de malanga "Viequera" (*Xanthosoma* spp.) Rev Colomb Biotecnol 13(2):97-106.
20. Vidal N, Blanco B, Cuenca B (2015) A temporary immersion system for micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut. Plant Cell Tiss Organ Cult 123:229–243.
21. Mendonça EG, Stein VC, de Carvalho HH (2016) The use of continuous, temporary immersion bioreactor system and semisolid culture medium for the production Of *Eucalyptus camaldulensis* clone. Ci FI 26(4):1211-1224.
22. Pérez-Pérez JL, Fonseca-Yero M, Bahi-Arevich M (2020) In vitro multiplication of *Morus alba* L. Criolla variety in temporary immersion systems. Pastos y Forrajes 43(3)221-229, 2020.
23. Carrión A, Tapia M (2019) Yield of five potato varieties in Temporary Immersion Bioreactors. Per J Agr 3(1):24 – 28.

24. Jiménez E, Pérez N, de Feria M, *et al.* (1999) Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *PCTOC* 59:19–23.
25. Cabrera M, Gómez R, Espinosa E, *et al.* (2011) Yam (*Dioscorea alata* L.) microtuber formation in Temporary Immersion System as planting material. *Biotecnol Apl* 28:268-271.
26. Cabrera M, Gómez R, Rayas A *et al.* (2009) Performance of yam microtubers from temporary immersion system in field conditions. *Afr J Biotechnol* 10(46):9268-9271.
27. Chávez-García JA, Andrade-Rodríguez M, Juárez-López P *et al.* (2018) Evaluación de tres sistemas de cultivo in vitro para la multiplicación de microcormos de gladiolo. *Rev Fitotec Mex* 41(4-A):551-554.
28. Cortes-Morales JA, López-Laredo AR, Zamilpa A, *et al.* (2018) Morphogenesis and secondary metabolites production in the medicinal plant *Castilleja tenuiflora* Benth. under nitrogen deficiency and starvation stress in a temporary immersion system. *Rev Mex Ing Quim* 17(1):229-242.
29. Lu S, Merkle SA (2020) Enhancing hybrid Liquidambar somatic seedling production using a temporary immersion bioreactor. *TREES-STRUCT FUNCT* 35(2):503–512. doi: 10.1007/s00468-020-02052-0.
30. Monja-Mio KM, Olvera-Casanova D, Herrera-Alamillo MÁ *et al.* (2021) Comparison of conventional and temporary immersion systems on micropropagation (multiplication phase) of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora', *3 Biotech* 11(2):1–8. doi: 10.1007/s13205-020-02604-8.
31. Klimek-Szczykutowicz, M. *et al.* (2020) 'Phytochemical and biological activity studies on *Enterolobium contortisiliquum* pods', *Molecules*, 25(22), p. 5227. doi: 10.3390/molecules25225257.
32. Posada-Pérez L, Montesinos YP, Guerra DG *et al.* (2017) Complete germination of papaya (*Carica papaya* L. cv. 'Maradol Roja') somatic embryos using temporary immersion system type RITA® and phloroglucinol in semi-solid culture medium. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 53(5): 505–513. doi: 10.1007/s11627-017-9842-5.
33. Ekmekçigil M, Bayraktar M, Akkuş Ö *et al.* (2019) High-frequency protocorm-like bodies and shoot regeneration through a combination of thin cell layer and RITA® temporary immersion bioreactor in *Cattleya forbesii* Lindl. *PCTOC* 136(3): 451–464. doi: 10.1007/s11240-018-1526-2.
34. Arano-Avalos S, Gómez-Merino FC, Mancilla-Álvarez E *et al.* (2020) 'An efficient protocol for commercial micropropagation of malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) using temporary immersion', *Sci. Hortic* 261: doi: 10.1016/j.scienta.2019.108998.
35. Leyva-Ovalle OR, Bello-Bello JJ, Murguía-González J *et al.* (2020) Micropropagation of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler *et al.* W. E. Higging in Temporary Immersion Systems. *3 Biotech*: 10(1):1–8. doi: 10.1007/s13205-019-2010-3.
36. Kim, NY, Hwang HD, Kim JH *et al.* (2020) Efficient production of virus-free apple plantlets using the temporary immersion bioreactor system. *HEB* 61(4):779–785. doi: 10.1007/s13580-020-00257-3.
37. Mosqueda Frómata O, Escalona MM, Teixeira JA *et al.* (2017) In vitro propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus *ex* Hooker f. in a temporary immersion bioreactor. *PCTOC* 129(3):543–551. doi: 10.1007/s11240-017-1186-7.
38. Vives K, Andújar I, Lorenzo JC *et al.* (2017) Comparison of different in vitro micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion bioreactor (BIT®), *PCTOC* 131(1):195–199. doi: 10.1007/s11240-017-1258-8.
39. Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG (2016) Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 52(2):154–160. doi: 10.1007/s11627-015-9735-4.

Capítulo V

Generación de Nuevas Variedades de Plantas Mediante Mejoramiento Genético por Mutaciones

Generation of New Plant Varieties by Genetic Improvement Through Mutation

Prasad Rout Nutan^{1*} y Alicia Anahí Herrera-Olivas¹

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México, CP 45019., *Autor correspondencia: nutan@ciatej.mx

Introducción

El mejoramiento genético en plantas es el proceso basado en principios y métodos para la obtención de nuevas variedades de plantas de cultivo, que garantizan en altas condiciones ambientales y de producción, rendimientos altos y estables de los productos cultivados con la calidad requerida. Para adaptarse a la creciente presión de estrés biótico y abiótico (ambiental), nuestros cultivos actuales deberán adaptarse para ofrecer mayores rendimientos para alimentar a una población en crecimiento. Hoy en día existen muchas técnicas modernas para el mejoramiento genético de plantas. El mejoramiento mediante mutación inducida es una herramienta poderosa no transgénica que introduce nuevas variaciones de cultivos con los rasgos deseables. La mutación puede ser inducida por diferentes agentes como mutágenos químicos, luz ultravioleta, rayos x, rayos gamma, etc. Hay 170 especies de plantas y 3222 variedades mutantes que se han desarrollado oficialmente en 60 países de todo el mundo. Esta liberación de variedades es posible debido al uso extensivo de la mutación inducida durante 50 años en actividades de fitomejoramiento en todo el mundo. Hoy en día existe un potencial enorme para la mejora futura de cultivos mediante la aplicación de mutaciones inducidas en especies de plantas. Mundialmente muchos institutos están involucrados en estas actividades de investigación, un ejemplo es el CIATEJ A. C. que cuenta con experiencia y ha generado nuevas variedades a través de este programa de mejoramiento vegetal.

El mejoramiento de las especies cultivadas comenzó hace más tiempo de lo que imaginamos, precisamente cuando inició la agricultura. Los primeros agricultores, intuitivamente seleccionaron semillas de aquellas plantas que producían los mejores frutos, estos agricultores ya comenzaron a seleccionar a los cultivos como los conocemos en la actualidad, hace ya más de 10 siglos. [16]. Una de las claves para la agricultura sostenible es la creación de variación genética en cultivos de plantas [10]. Debemos mejorar las variedades disponibles ya que solo hay un número limitado de especies. Aproximadamente 200,000 especies de plantas han sido encontradas en la naturaleza. Una pequeña fracción de ellas (alrededor de 3000) están realmente probadas y verificadas para uso en

Introduction

Plant genetic improvement is the process based on principles and methods to obtain new plant variety cultivations, which in high environmental conditions guarantee high and stable yields of the crop products with the required quality. To adapt to the growing biotic and abiotic (environmental) stress, current crops should adapt to offer greater yields to feed a growing population. Nowadays, many modern techniques exist for genetic plant improvement. Improvement by induced mutation is a powerful non-transgenic tool that introduces new crop variations with the desired features. Mutation may be induced by different agents, such as mutagenous chemicals, ultraviolet light, X rays, gamma rays, and so on. Currently, 170 plant species and 3 222 mutant varieties have been developed officially in 60 countries around the world. This liberation of varieties is possible because of the extensive use of induced mutation in phytoimprovement worldwide for 50 years. Currently, an enormous potential exists for future crop improvement by applying induced mutations in plant species. Many institutes worldwide are involved in these research activities, for example, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Asociación Civil (CIATEJ) has experience and generated new varieties through this program of plant improvement.

Improvement of crop species started long time ago – precisely when agriculture started. The first farmers intuitively selected seeds of those plants that produced better fruits. These farmers had already started to select crops as they are known now – more than 10 centuries ago [16]. One of the keys for sustainable agriculture is the creation of genetic variation in plant cultivations [10]. The varieties available should be improved since only a limited number of species exist. Approximately, 200,000 plant species have been found in nature. A small fraction of them (~3000) have really been tested and verified for their use in food (animal and human), spices, and other needs. Only 15% of the plant

alimentos (animal y humano), especias y otras necesidades. Solo el 15% de las especies de plantas están domesticadas y sorprendentemente, hay solo 15-20 especies que se utilizan en todo el mundo para la producción de alimentos [3, 4]. Al ser un número tan limitado de especies de plantas para alimentar a toda la población mundial, necesitamos mejorar la calidad de plantas para nulificar la fuerza del cambio climático y alimentar la creciente población mundial.

Importancia del mejoramiento genético:

Hay dos desafíos importantes para todos los campos relacionados a la investigación agrícola y ambiental:

- 1) El aumento de la demanda de productos a base de plantas va a crecer hasta en un 70% en las próximas tres o cuatro décadas. Se estima que la creciente población de un número actual de 7,6 mil millones de personas en este planeta aumentará a alrededor de 10 mil millones para el 2050 y se urbanizará cada vez más disminuyendo el número de productores de alimentos.
- 2) Los efectos negativos del cambio climático en la eficiencia en la producción de alimentos, así como sobre su calidad en todo el mundo [15, 30, 6].

El mejoramiento genético en plantas genera nuevas variedades que garantizan rendimientos altos y estables de los productos cultivados con la calidad requerida. El objetivo de mejorar el rendimiento de los cultivos depende del tipo de cultivo. La mejora del rendimiento del cultivo se realiza básicamente por los siguientes factores:

- Mayor rendimiento: Puede lograr un mayor rendimiento de cultivos desarrollando cultivos HYV (variedad de alto rendimiento).
- Mejor calidad: Existen diferentes razones para mejorar la calidad de diferentes cultivos, como por ejemplo la mejora de la calidad de la panificación en cereales como el trigo y la mejora de la calidad proteica en las legumbres.
- Resistencia biótica y abiótica: Debemos desarrollar cultivos que sean resistentes a estrés biótico, como insectos y enfermedades y estrés abiótico, como calor, salinidad y frío.
- Varias características agronómicas deseables: Se puede lograr una mayor producción mediante el desarrollo de variedades de cultivos que contengan las características agronómicas deseables para sostener las diversas amenazas durante el proceso de producción. Por ejemplo: el azúcar en el agave, los carotenoides en el cempasúchil, la vida de anaquel en rosas.
- Mayor adaptabilidad de los cultivos: Al desarrollar cultivos con mejor adaptabilidad a las cambiantes condiciones climáticas y nutricionales, podemos estabilizar la producción de cultivos.

species have been modified, and surprisingly, only 15-20 species are used in all the world for food production [3, 4]. Because a very limited number of plant species feed all the world population, plant quality needs to be improved to overturn climate change and feed the growing world population.

Importance of genetic improvement

Two important challenges exist in all the fields related to agriculture and environment research:

- 1) Increase in product demand based on plants that could grow up to 70% in the next three or four decades. Population growth has been estimated in a current number of 7.6 mil millones billion persons in this planet, which will have increased around 10 billion by 2050. Moreover, as urbanization extends more each time, the number of food producers decreases;
- 2) Negative effects of climate change on food production affect efficiency on food production, as well as on their quality worldwide [15, 30, 6].

Plant genetic improvement generates new varieties that guarantee high yields of cultivated products with the quality required. The objective of improving crop yield depends on the type of crop. Crop yield improvement is performed basically by the following factors:

- Greater yield: greater crop yield may be achieved by developing high yield variety (HYV) crops;
- Better quality: different reasons exist to improve quality of different crops, as improving breadmaking quality in cereals, such as wheat and proteic quality improvement in legumes.
- Biotic and abiotic resistance: crops resistant to biotic (insects and diseases) and abiotic (heat, salinity, and cold) stress should be developed;
- Several desirable agronomic characteristics: a greater production may be achieved by developing crop varieties that contain the same desirable agronomic characteristics to sustain the diverse characteristics threatened during the production process, for example, sugar in agave, carotenoids in Mexican marigold (*Tagetes erecta*), shelf-life in roses.
- Greater crop adaptability: when crops are developed with better adaptability to changes in nutritional and climate conditions, crop production can be stabilized.

Camino para lograr el mejoramiento genético

El mejoramiento genético vegetal es la creación y generación de plantas con rasgos deseados en términos de color, forma, tamaño, duración de la floración, madurez, olor, sabor, resistencia a enfermedades e insectos y otras características. El mejoramiento genético vegetal comprende cinco importantes áreas (Fig. 1):

1. Cruzamiento: Combinación de dos especies sexualmente compatibles con el fin de crear nueva variedad.
2. Hibridación: La mejora vegetal aplica los principios de la genética para producir variedades.
3. Mutagénesis inducida: Uso de agentes mutágenos físicos y químicos para generar variaciones y nuevas líneas vegetales.
4. Poliploidía inducida: Multiplicación del número de cromosomas de un cultivo para impactar la calidad y cantidad de las plantas.
5. Modificación genética: Manipulación de genes (ingeniería genética) para la obtención de nuevas variedades con rasgos deseados.

The road to achieve genetic improvement

Plant genetic improvement may achieve the desired features in terms of color, shape, size, flowering duration, maturity, aroma, flavor, resistance to diseases and insects, and other characteristics, so it comprises five important areas (Fig. 1):

1. Crossbreeding: combination of two sexually compatible species with the purpose of creating a new variety.
2. Hybridization: plant improvement applies the genetic principles to produce varieties.
3. Induced mutagenesis: use of physical and chemical mutagenic agents to generate new plant lines.
4. Induced polyploidia: multiplication of chromosome number in a crop to impact plant quality and quantity.
5. Genetic modification: gene manipulation (genetic engineering) to obtain new varieties with the desired features.

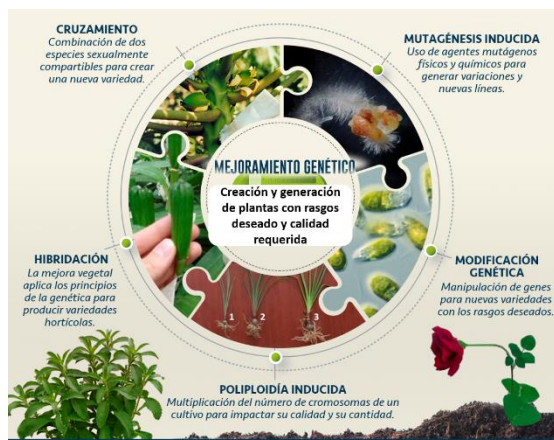


Figura 1. Proceso de mejoramiento genético para generar variedades de plantas.

Figure 1. Genetic improvement process to generate plant varieties.

La mutagenesis inducida vegetal está alcanzando la época moderna como consecuencia de las técnicas moleculares y bioquímicas que no se clasifican como OGM. Estas son mucho mejores que el mejoramiento convencional, ya que inducen una gran variación de poblaciones con mutagenicidad mediante nuevos métodos de detección [25].

Plant induced mutagenesis is reaching modern age as a consequence of molecular and biochemical techniques that are not classified as genetically modified organisms (GMO). They are much better than conventional improvement since they induce a great variation of populations with mutagenicity by means of new detection methods [25].

Mejoramiento genético por mutaciones

La mutación es el cambio hereditario del material genético; los individuos que manifiestan características modificadas debido a cambios hereditarios se conocen como mutantes [17]. El fenómeno puede manipularse mediante una aplicación artificial llamada mutación inducida [23].

La demanda creciente de variedades novedosas de plantas implica un reto para los fitomejoradores. Muchos objetivos de los programas de mejoramiento genético consisten en lograr cambios morfológicos e inducir resistencia a enfermedades, plagas y factores abióticos adversos, entre otras características agronómicas sobresalientes, las cuales se pueden lograr a través de la inducción de mutaciones [28].

El mejoramiento por mutaciones emplea tres tipos de mutagénesis. Se trata de mutagénesis inducida (Fig. 2); en la que las mutaciones ocurren como resultado de la irradiación (rayos gamma, rayos X, iones haz, etc.) o tratamiento con mutágenos químicos, mutagénesis dirigida; que es el proceso de crear una mutación en un sitio definido en una molécula de ADN, y mutagénesis de inserción; que se debe a inserciones de ADN, ya sea a través de la transformación genética y la inserción de T-DNA o activación de elementos transponibles [14; 9].

Genetic improvement by mutations

Mutation is the hereditary change of the genetic material; the individuals that show modified characteristics due to hereditary changes are known as mutants [17]. The phenomenon may be manipulated by an artificial application called induced mutation [23].

The growing demand of novel plant varieties implies a challenge for phytoimprovers. Thus, the objective of the genetic improvement programs consist of achieving morphological changes and inducing resistance to diseases, pests, and adverse abiotic factors, among other outstanding agronomic characteristics, which can be achieved through mutation induction [28].

Improvement by mutation uses three types of mutagenesis. (1) Induced mutagenesis (Fig. 2), in which mutations occur as a result of radiation (gamma rays; X rays; ion beams; etc.) or treatments with chemical mutagens; directed mutagenesis, which is the process of creating a mutation in a definite site in a DNA molecule; and insertion mutagenesis, which is due to DNA insertions either through genetic transformation and T-DNA insertion or activation of transposable elements [14; 9].

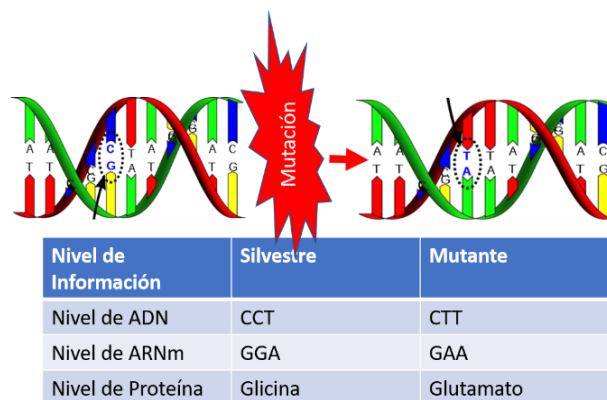


Figura 2. Mutación puntual: Un cambio de una base en una cadena de ADN se refleja en nivel de la proteína.
Figure 2. Punctual mutation: A base change in a DNA chain reflects on the protein level.

El porcentaje de variedades mutantes por mejoramiento por mutación está constituido por 49,5% de cereales, 21,9% de plantas y flores ornamentales, 15% de leguminosas, 2,4% de frutos secos, 2,4% de cultivos de hortalizas, 2,3% de cultivos de fibra, 2,1% de cultivos oleaginosos, 1,2% de cultivos forrajeros, 0,6% de tubérculos, 0,4% de hierbas, 0,2% de plantas medicinales y 2% de otros cultivos [8] (Fig. 3). Hay más de 3222 variedades comerciales mutantes registradas y la mayoría de ellas son de los continentes de

The percentage of mutant varieties by mutation improvement is constituted by 49.5% cereals, 21.9% plants and ornamental flowers, 15% legumes, 2.4% dried fruit, 2.4% vegetables, 2.3% fiber crops, 2.1% oleaginous crops, 1.2% forage, 0.6% de tubers, 0.4% herbs, 0.2% medicinal plants and 2% other crops [8] (Fig. 3). More than 3 222 mutant commercial varieties are recorded and most of them are from the Asian continent [19]. Among those, China has the highest

Asia [19]. Entre los que China tiene el nivel más alto con 810 number with 810 varieties, followed by Japan and variedades, seguido de Japón con 481 e India con 330 [8] India with 481 and 330, respectively [8] (Fig. 4). (Fig. 4).

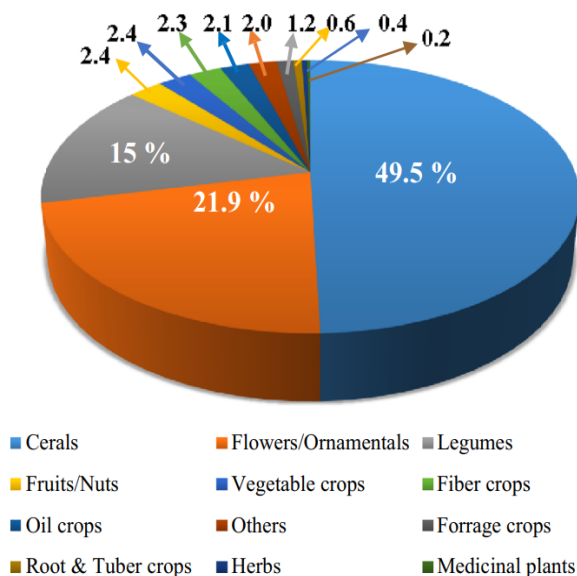


Figura 3. El porcentaje de variedades mutantes por mejoramiento por mutación [8].
Figure 3. Mutant variety percentage by mutation improvement [8].

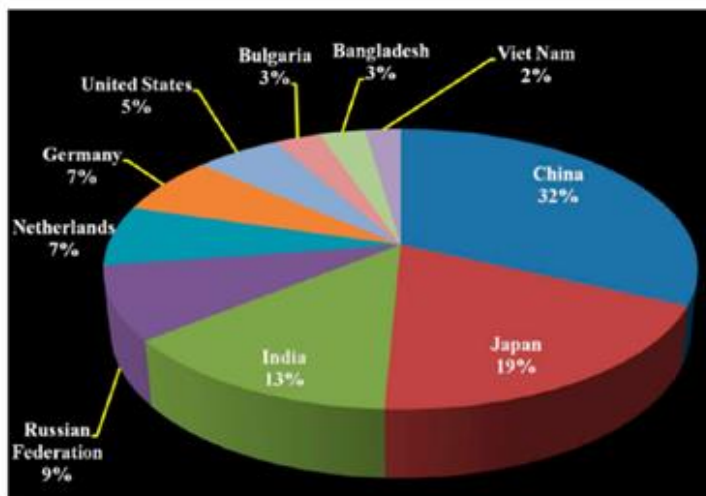


Figura 4. Variedades comerciales mutantes registradas mundialmente [8].
Figure 4. Commercial mutant varieties recorded worldwide [8].

Mejoramiento genético por mutaciones químicas

Los agentes mutagénicos químicos generan cambios estables y heredables debido a que induce alteraciones en

Genetic improvement by chemical mutation

The chemical mutagenic agents generate stable and inheritable traits because they induce alterations in

nucleótidos simples, lo que puede formar una serie alélica nueva. Para mejorar rasgos limitados (uno o dos) y evitar cambios indeseables, se pueden preferir los mutágenos químicos [17]. Más de 80 % de los mutágenos aplicados en plantas son agentes alquilantes, el mutágeno químico más común utilizado en plantas es el etilo-metano-sulfonato (EMS) y la N-metil-N-nitrosourea (MNU) (Fig. 5a). Otros son el metilo-metano-sulfonato (MMS), el fluoruro de hidrógeno (HF), la azida de sodio (SA), y la hidroxilamina (H₃NO) [21]. La mayoría de las sustancias químicas indujeron un 50% de mutaciones silenciosas o sin sentido [18].

En su mayoría, el metano sulfonato de etilo (EMS) causa mutaciones a través de la alquilación de bases de guanina que conducen a (des) coincidencias con timina en lugar de citosina, lo que resulta en transiciones de G / C a A / T [17]. La mutagénesis de EMS implica remojar las semillas en una solución con una concentración conocida de EMS, generalmente de 0,2 a 2,0%. El tiempo en la solución de remojo varía de 10 a 20 h [17]. N-metil-N-nitrosourea (MNU) es el mutágeno más aplicado en el arroz [6]. MNU es de alta reactividad con átomos de oxígeno en la molécula de ADN y promueve las transiciones G / C a A / T a través de desajustes con timina durante la replicación del ADN.

simple nucleotides, which may form new allelic series. To improve limited features (one or two) and avoid undesirable changes, chemical mutagens are preferable [17]. More than 80% of the applied mutants in plants are alkylating agents, and the most common chemical mutagens used in plants are ethyl methanesulfonate (EMS) and N-methyl-N-nitrosourea (MNU) (Fig. 5a). Others are methyl-methanesulfonate (MMS), hydrogen fluoride (HF), sodium azide (SA), and hydroxylamine (H₃NO) [21]. The majority of the chemical substances induced are 50% of silent or nonsense mutations [18].

In their majority, EMS causes mutations through alkylation of guanine bases that lead to (des) coincidence with thymine instead of cytosine, which results in G / C to A / T transitions [17]. EMS mutagenesis implies soaking seeds in a solution with a known EMS concentration, generally from 0.2 to 2.0%. Soaking time in the solution varies from 10 to 20 h [17]. MNU is the most applied mutagen in rice [6], which has high reactivity with oxygen atoms in the DNA molecule and promote in G / C to A / T transitions through disadjusting thymine during DNA replication.

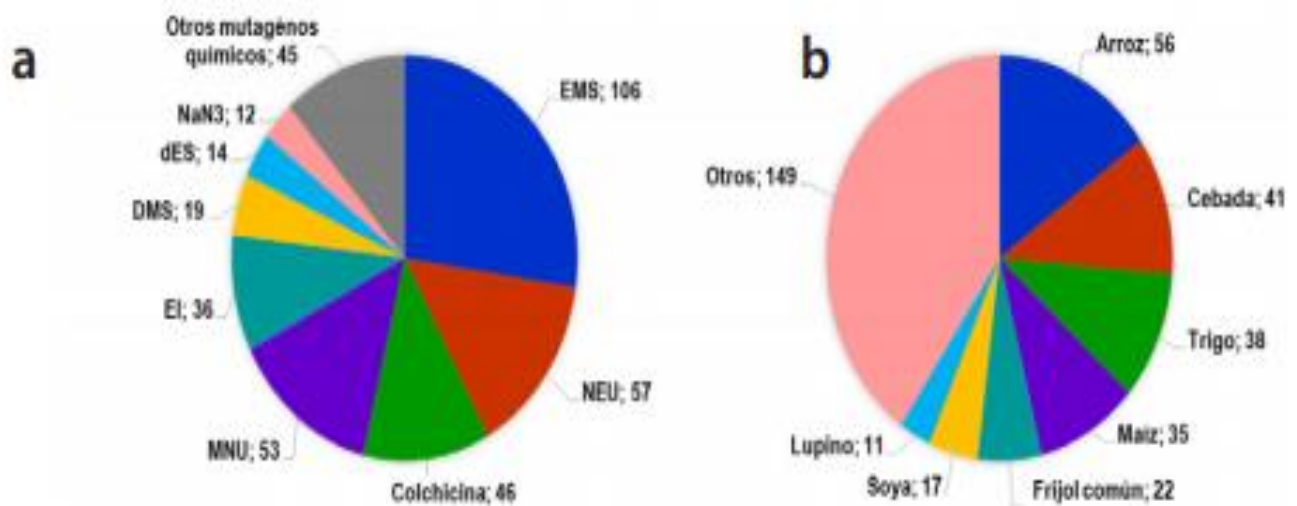


Figura 5. Los mutágenos químicos se aplican con mayor frecuencia en la generación de variedades mutantes. (a) Entre los principales agentes se encuentran EMS (etil metanosulfonato), con 106 variedades mutantes registradas oficialmente, NEU (nitrosoetil urea) con 57, MNU (N-metil N-nitrosourea) con 53, colchicina con 46 y EL (etilenimina) con 36. (b) Variedades de cultivos mutantes lanzados y oficialmente registrados en el MVD producidos por mutagénesis química [8].

Figure 5. Chemical mutagens are applied with greater frequency in mutant variety generation. (a) The main agents recorded are EMS (ethyl methanesulfonate) with 106; NEU (nitroso ethyl urea) with 57; MNU (N-methyl N-nitroso urea) with 53; colchicine with 46; and EL (ethylenimine) with 36; (b) Mutant crop varieties launched and officially registered in Mutant Variety Database (MVD) and produced by chemical mutagenesis [8].

Mejoramiento genético por mutaciones físicas

Los diferentes tipos de radiaciones que tienen propiedades mutagénicas se conocen como mutágenos físicos [22], donde los átomos son el principal material de origen. Los átomos inestables del mismo elemento con diferentes pesos proporcionan partículas de energía llamadas radioisótopos, y las ondas electromagnéticas asociadas con la desintegración nuclear se denominan radiación [13]. Estos agentes mutagénicos producen especies reactivas con el oxígeno que interactúan con el ADN y causan daño oxidativo, como modificaciones en las bases que induce múltiples rupturas simples o dobles en la cadena del ADN [20]. Las radiaciones se clasifican en dos tipos según sus niveles de energía. Radiaciones no ionizantes, por ejemplo, rayos UV, cuyas radiaciones con niveles de energía más bajos son capaces de provocar excitaciones al nivel de las bases nitrogenadas del material genético. Radiaciones ionizantes, por ejemplo, rayos alfa, rayos X, rayos gamma. Los mutágenos físicos se han utilizado ampliamente para inducir aberraciones hereditarias y más del 70% de las variedades mutantes se desarrollaron mediante mutagénesis física [12]. Los rayos X fueron los primeros que se utilizaron para inducir mutagénesis [1]. Entre todos los rayos, los rayos gamma tienen una longitud de onda más corta, la capacidad de penetrar más profundamente en el tejido [2]. Su efecto mutagénico se debe principalmente al rompimiento de la doble hebra del ADN. Varios mutantes se han desarrollado mediante radiación gamma [15].

Etapas de desarrollo de mutantes

Es necesario tener en cuenta varios aspectos antes de iniciar un programa de mutagénesis inducida. Hay tres factores importantes para el éxito de la reproducción por mutaciones: la tipa y la eficacia de la mutagénesis, el material vegetal de partida y la verificación y selección de mutantes [11] (Fig. 6).

Mutágeno

Para obtener un mutante, la dosis del mutágeno debe ser suficientemente alta para aumentar la probabilidad de inducir una mutación, sin embargo, no debe ser tan alta como para causar daño a las células/tejidos resultando en letalidad. Generalmente, las poblaciones irradiadas se generan mediante el uso de un tratamiento de dosis LD 50 y con una dosis inferior a LD 50 [24]. Esta dosis es con la que se reduce la supervivencia y el crecimiento al 50 % en relación con el tratamiento control, y es donde se obtiene la mayor cantidad de mutaciones. Algunos autores recomiendan un intervalo de 20 % superior e inferior [7]. La dosis de mutágeno químico se determina teniendo en cuenta las propiedades del mutágeno (vida media, penetrabilidad,

Genetic improvement by physical mutations

The different types of traditions that have mutagenic properties are known as physical mutagens [22], where atoms are the main material of origin. Unstable or radioactive atoms of the same element with different weight provide energy particles called radioisotopes, and the electromagnetic waves associated with nuclear disintegration are called radiation [13]. These mutagenic agents produce reactive oxygen species, interacting with DNA and causing oxidative stress, since modification in the bases induce multiple simple and double DNA chain ruptures [20]. Radiations are classified in two types according to their energy levels. Non-ionizing radiation are, for example, UV rays, whose radiations with lower energy levels are capable of causing excitations at the level of nitrogenous bases of the genetic material. Ionizing radiation techniques are, for example, alpha rays, X-rays, and gamma rays. Physical mutagens have been widely used to induce hereditary aberrations and more than 70% of mutant varieties have been developed by physical mutagenesis [12]. X-rays were the first ones to be used to induce mutagenesis [1]. Among all the rays, gamma rays have the shortest wavelength, the capacity to penetrate more deeply in the tissue [2]. Their mutagenic effect is due mainly to double-strand DNA breaks. Several mutants have been developed by gamma radiation [15].

Developmental stages of mutants

Several aspects should be taken into account before starting an induced mutagenesis program. Three factors are important for the reproduction success by mutations: mutagenesis type and efficacy; starting point plant material; and mutant verification and selection [11] (Fig. 6).

Mutagenous

To obtain a mutant, the mutagenous dose should be sufficiently high to increase the probability of inducing a mutation but not so high as to cause cell/tissue damage that would be lethal. Generally, irradiated populations are generated by means of using a dose treatment of LD 50 and one lower than LD 50 [24]. This dose is with which survival and growth is reduced to 50% with respect to the control treatment, and where the greatest number of mutations are obtained. Some authors recommend an interval of 20% higher and lower [7]. The chemical mutagen dose is determined taking into account the mutagen properties (average

solubilidad, toxicidad o reactividad); tipo y condición del material tratado antes, durante y después del tratamiento; interacción con el tejido diana y el medio de cultivo; pH del medio; y manipulación del material después del tratamiento [29] (Fig. 6).

Material vegetal

El material vegetal como las semillas, plantas y explantes deben estar bien considerados para generar mutantes. El efecto del mutágeno es diferente con respecto al tipo de materiales en diferentes variedades. Debe calcularse la dosis tácticamente y debe determinarse la cantidad de LD50 necesaria para generar variaciones adecuadas.

Selección de mutantes

Un método de detección apropiado es un importante requisito previo para el éxito en un mejoramiento por mutación. Según Suprasanna [26], un gran número de individuos de plantas tienen que ser cribados en la generación M2 y es necesario un método rápido y económico de cribación. Es más fácil seleccionar las poblaciones en busca de mutaciones en altura de la planta, fecha de floración o pigmentación que se pueden determinar visualmente. Para la correcta comparación se debe plantar el padre original en números suficientes. Las filas de la variedad padre tal vez introducidas después de un cierto número de filas de la población M2 (Fig. 6).

En caso de seleccionar un mutante resistente a enfermedades es necesario que la población de M2 se cultive en un lugar caliente donde la enfermedad está presente todo el tiempo. Si las condiciones no son adecuadas para que ocurra la enfermedad o sea esparcida por sí sola, se puede rociar el inóculo. Dependiendo de la naturaleza del rasgo de interés, se puede emplear la metodología de cribado. Por ejemplo, para aislar mutantes para resistencia/tolerancia al estrés biótico o abiótico, se debe de aplicar un estrés relevante. El factor debe emplearse durante el cribado después del tratamiento mutágeno en M2 o generación posterior. En la figura 6 se muestra un diagrama de flujo del proceso de desarrollo que conduce a generar mutantes.

life, penetrability, solubility, toxicity, or reactivity); type and condition of the material treated before, during, and after treatment; interaction with the target tissue and culture medium; medium pH; and manipulation of the material before treatment [29] (Fig. 6).

Plant material

Plant material, such as seeds, plants, and explants should be considered for generating mutants. The mutagenesis effect is different with respect to the type of materials in different materials. The dose should be calculated tactically, determining the necessary LD50 quantity to generate the adequate variations.

Mutant selection

An appropriate detection method is an important previous requirement for a successful improvement by mutation. According to Suprasanna [26], a great number of plant individuals in the M2 generation need SIFT (Sort Intolerant From Tolerant), a fast and economic method cribados. It is easier to select a population when searching mutation in plant height, flowering date or pigmentation that may be determined visually. For the correct comparison, the original progenitor should be planted in a sufficient number. The rows of the progenitor variety could be introduced after a certain number of M2 population rows (Fig. 6).

In case of selecting a resistant mutant to diseases, the M2 population should be cultivated in a hot place where the disease is present all the time. If the conditions are not adequate for the disease to occur or spread on its own, the inoculant may be sprayed. Depending on the nature of the feature of interest, the SIFT methodology may be used. For example, to isolate mutants for resistance/tolerance to biotic or abiotic stress, a relevant stress should be applied. The factor should be used during SIFT after the mutagen treatment in M2 or subsequent generation. Figure 6 shows a flux diagram of the development process that conducts to generating mutants.



Figura 6. Etapas de desarrollo de mutantes generados
Figure 6. Development stages of generated mutants

Conclusión

Se puede inducir la mutación y lograr generar una nueva variedad con los rasgos deseados mediante este programa de mejoramiento por mutaciones. Se han reportado casi 4000 mutantes en todo el mundo, pero probablemente México hay muy pocos de ellos. Las técnicas están estandarizadas y muchas técnicas nuevas están ayudando a respaldar este programa de cría. Es una categoría no transgénica y es mejor que los programas de mejoramiento tradicionales, ya que consume menos tiempo, puede funcionar con pocos rasgos, el proceso de selección está bien versado y es económico. En todo el mundo, así como en México, nuevos científicos se están fusionando a este campo. Nuestro centro, CIATEJ A. C, también ha generado algunas variedades mediante esta técnica. Sin duda, las mutaciones inducidas están preparadas para desempeñar un papel más importante en los tiempos venideros.

Conclusion

Mutation can be induced to achieve generating a new variety with desired features by this improvement program. Almost 4 000 mutants have been reported around the world, but probably in Mexico very few of them are found. Techniques are standardized and many new techiques are helping to backup this breeding program. It is a non-transgenic category and better than the traditional improvement programs since it takes less time; it may function with few features, the selection process is well versed and it is economic. In all the world as in Mexico, new scientists are getting together in this field. In our Center, CIATEJ has also generated some varieties by this technique. Undoubtedly, induced mutation is ready to perform a more important role in the near future.

Referencias References

1. Acquaaah G (2006) Principles of plant genetics and breeding. Chichester: Wiley-Blackwell
2. Amano E (2006) Use of induced mutants in rice breeding in Japan. *Plant Mutation Rep.* 1(1):2124.
3. Balick MJ (1997) Plants, People, and Culture: The Science of Ethnobotany, vol. 9, Scientific American Library, New York, NY, USA.
4. Chrispeels MJ, Sadava DE (2003) Plants, Genes, and Crop Biotechnology, vol. 24, Jones and Bartlett, Boston, Mass, USA, 2nd edition.
5. Easterling WE, Aggarwal PK, Batima P, *et al.* (2007) Food, fibre and forest products. In M.L. Change, O.F. Parry, J.P. Canziani, P.J. Palutikof, van der Linden and C.E. Hanson (Eds.), *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate.* Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 273–313.
6. FAO (2019). The state of food security and nutrition in the world. Safeguarding against economic slowdowns and downturns, FAO Rome.
7. Food and Agriculture Organization of the United Nations / International Atomic Energy Agency (FAO/IAEA) (1977) Manual on mutation breeding. Technical report series 119. Vienna: Author.
8. FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture (2018) Mutation Breeding. Accessed: August 2018. Available from: <http://www-naweb.iaea.org/nafa/pbg/mutation-breeding.html>
9. Forster BP, Shu QY (2012) Plant mutagenesis in crop improvement: basic terms and applications. In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H, editors. *Plant mutation breeding and biotechnology.* Wallingford: CABI; p. 9-20
10. Griggs D, Stafford-Smith M, Gaffney O, *et al.* (2013). Sustainable development goals for people and planet. *Nature*, 495(7441), 305-307.
11. Hase Y, Okamura M, Takeshita D, *et al.* (2010) Efficient induction of flower-color mutants by ion beam irradiation in petunia seedlings treated with high sucrose concentration. *Plant Biotechnol* 27:99–103
12. Jeng TL, Ho PT, Shih YJ, *et al.* (2011). Comparisons of protein, lipid, phenolics, γ -oryzanol, vitamin E, and mineral contents in bran layer of sodium azide-induced red rice mutants. *J. Sci. Food Agric.* 91, 1459–1465. doi: 10.1002/jsfa.4333
13. Kayalvizhi K, Kannan M, Ganga M (2017) Effect of physical and chemical mutagens on morphological characters in M1V2 generation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4), 2492-2499.
14. Kharkwal MC, Shu QY (2009) The role of induced mutations in world food security. In: Shu QY, editor. *Induced plant mutations in the genomics era.* Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; p. 33-38.
15. Mahadevappa M, Ikehashi H, Coffman WR, *et al.* (1983) Improvement of native rice for earliness through induced mutagenesis. *Oryza* 20(1):40-46
16. Mba C, Afza R, Shu QY (2012) Mutagenic radiations: X-rays, ionizing particles and ultraviolet. In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H, editors. *Plant mutation breeding and bio-technology.* Wallingford: CABI; p. 8390
17. Mba C. (2013). Induced mutations unleash the potentials of plant genetic resources for food and agriculture. *Agronomy*, 3(1), 200-231.
18. Nawaz Z, Shu Q (2014). Molecular nature of chemically and physically induced mutants in plants: a review. *Plant Genet. Resour.* 12, 74–78. doi: 10.1017/S1479262114000318
19. Oladosu Y, Rafii MY, Abdullah N, *et al.* (2016) Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: A review. *Biotechnology and Biotechnological Equipment.* 30(1):1-16

20. Pacher M, Puchta H. (2017). From classical mutagenesis to nuclease-based breeding-directing natural DNA repair for a natural end-product. *The Plant Journal*, 90(4), 819- 833.
21. Parry MAJ, Madgwick PJ, Bayon C, *et al.* (2009). Mutation discovery for crop improvement. *J. Exp. Bot.* 60, 2817–2825. doi: 10.1093/jxb/erp189
22. Rieger R, Michaelis A, Green M (1976) *Glossary of Genetics and Cytogenetics*. Springer Verlag, New York
23. Roychowdhury R, Tah J. (2013) Mutagenesis a potential approach for crop improvement. In: Hakeem KR, Ahmad P, Ozturk M, editors. *Crop improvement: new approaches and modern techniques*. New York (NY): Springer; p. 149-187
24. Shu QY, Forster BP, Nakagawa H (2012) Principles and applications of plant mutation breeding. In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H (eds) *Plant mutation breeding and biotechnology*. CABI Publishing, Wallingford, pp 301–324
25. Sikora P, Chawade A, Larsson M, *et al.* (2011). Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. *International journal of plant genomics*.
26. Suprasanna P, Mirajkar SJ, Bhagwat SG (2015). Induced mutations and crop improvement. In *Plant biology and biotechnology* (pp. 593-617). Springer, New Delhi.
27. Talebi AB, Talebi AB, Shahrokhifar B (2012). Ethyl methane sulphonate (EMS) induced mutagenesis in malaysian rice (cv. MR219) for lethal dose determination. *Am. J. Plant Sci.* 3, 1661–1665. doi: 10.4236/ajps.2012.312202
28. Urrea AI, Ceballos S (2005). Empleo de las radiaciones gamma en la inducción de variabilidad genética en *Heliconia psittacorum*. *Actual Biology*, 27(82), 17-23.
29. Van Harten AM (1998) *Mutation breeding: theory and practical applications*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 137–158
30. Voss-Fels KP, Stahl A, Hickey LT (2019). Q&A: Modern crop breeding for future food security. *BMC Biology*, 17(1), 1-7.

Capítulo VI

Técnicas de Secado de Flores para Prolongar la Vida de Florero

Flower Drying Techniques to Extend Vase Life

José Manuel Rodríguez Domínguez^{1*}

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México, CP 45019. *Autor correspondencia: mrodriguez@ciatej.mx

Introducción

La Industria de la Floricultura se encuentra en constante crecimiento, siendo uno de los negocios más rentables a nivel mundial, países como Holanda, Colombia, Ecuador, Kenia y Etiopía son de los principales países exportadores de flores, seguidos por Malasia, China, Italia, Bélgica y Alemania [1]; México ocupa el lugar número 17 en la lista, siendo los principales estados productores de flores el Estado de México, Morelos y Puebla, seguidos de Sinaloa, Baja California, Ciudad de México, Michoacán, Jalisco, Veracruz, San Luis Potosí, Querétaro, Guerrero, Chiapas y Oaxaca, de los cuales, el Estado de México es el principal, ya que concentra la mitad de la superficie destinada a la siembra de flores, en todo el país [2,3].

Aun cuando la venta de flores es un negocio lucrativo, no es un producto que tenga ventas homogéneas durante todo el año, por ejemplo para nuestro país en fechas tales como el día de San Valentín, el Día de las Madres o el Día de los Muertos se incrementan las ventas, pero en otras fechas éstas disminuyen, lo que en ocasiones puede representar pérdidas a los productores y comerciantes florícolas debido al material que no se vende, pues las flores son un producto perecedero; todo esto aunado a situaciones tales como la Pandemia COVID-19 causada por el virus SARS-CoV-2, han producido una merma importante que es necesario considerar. Por esta razón, la preservación de flores se presenta como una alternativa para poder conservar el producto por un mayor tiempo, a fin de evitar o disminuir las dichas pérdidas.

A diferencia de las flores frescas, las flores preservadas presentan varias ventajas, pues al presentar una mayor vida de florero, se pueden almacenar de manera que podemos tener ejemplares de cualquier especie prácticamente en cualquier época del año, son biodegradables y no requieren consumo de agua [4]; otra ventaja es que se puede obtener material que comúnmente no se encuentra en florerías ya que muchas de ellas no pueden mantener su frescura una vez que se cortan y se separan de la planta madre, por lo que este material no es atractivo para el mercado de las flores frescas. Por otra parte, dentro de las desventajas de las flores preservadas es que se deben de manejar con más cuidado, ya que son más frágiles y delicadas que las flores

Introduction

The floral industry – one of the most profitable business worldwide – is in constant growth. Countries such as Holland, Colombia, Ecuador, Kenya, and Ethiopia are the main flower export countries, followed by Malaysia, China, Italy, Belgium, and Germany [1]. Mexico occupies number 17 in the list, whose main producers are the states of México, Morelos, and Puebla, followed by Sinaloa, Baja California, Mexico City, Michoacán, Jalisco, Veracruz, San Luis Potosí, Querétaro, Guerrero, Chiapas, and Oaxaca, of which State of Mexico is the main producer since it concentrates half of the surface destined for flower sowing in the country [2,3].

Although selling flowers is a lucrative business, it is not a product with homogeneous sales during the whole year. For example, in dates, such as Valentine's Day, Mother's Day, or Day of the Dead sales increase. However, on other dates, sales decrease which may represent loss for producers and floral businesses because the material is not sold, and flowers are perishable products. All of these factors, jointly with situations, such as COVID-19 pandemics caused by SARS-CoV-2 virus have produced an important decrease in sales that needs to be considered. Therefore, flower preservation comes to be an alternative to preserve the product for a longer time to avoid or decrease such loss.

Different from fresh flowers, those preserved show several advantages because with a longer vase life, they may be stored, so samples of any species are practically available at any time of the year; they are biodegradable and do not require water consumption [4]. Since flowers cannot maintain their freshness once cut and separated from their mother plant and thus not attractive for the fresh flower market, another advantage is that those not commonly found in the floral industry may be obtained. On the other hand, one of the disadvantages of preserved flowers is that they should be handled with care since they are more fragile and delicate than fresh ones. Moreover, flowers

frescas, además de que también pierden su aroma y muchas de ellas llegan a perder o disminuir la tonalidad de su color natural [5].

La preservación de flores no es un concepto nuevo, se han usado desde hace mucho tiempo, sin embargo, una de las primeras técnicas para preservarlas se desarrolló en 1991, a partir de flores frescas reemplazando su humedad interna con polietilenglicol [6]; a partir de entonces se han desarrollado una gran cantidad de técnicas, las cuales básicamente se agrupan en dos diferentes tipos: 1) el secado o deshidratado, que consiste en remover toda la humedad de las mismas y 2) el reemplazo del agua utilizado sustancias acuosas como la glicerina o el polietilenglicol; en ambos casos no se produce la descomposición de los tejidos de la flor, pues al no existir humedad en su interior, se evita el crecimiento de organismos saprófitos como bacterias, hongos, etc.

En la literatura podemos encontrar una gran diversidad de métodos y/o técnicas para la preservación de flores, e incluso para follaje [4,7,8,9,10,11,12,13,14], a continuación, se describen algunos de los principales métodos reportados, indicando sus ventajas, desventajas y usos:

Secado al aire

Descripción: Consiste en colgar las flores hacia abajo con la ayuda de hilos, cuerdas, ligas, alambres, limpiapipas etc., en un cuarto donde no exista demasiada humedad ambiental y con buena circulación de aire, permitiendo que éste lleve a cabo el secado de las flores.

Ventajas: es un método muy económico, ya que el material necesario es fácil de conseguir y de bajo costo.

Desventajas: Generalmente toma mucho tiempo, de 1 a 4 semanas; muchas de las flores pierden su forma original debido a la contracción de pétalos y/o brácteas, los colores rojos y rosados generalmente disminuyen su tonalidad, a diferencia de los azules y amarillos, los cuales sí se conservan.

Usos: Ésta técnica se utiliza para preservar flores pequeñas como las llamadas flores de relleno o follaje en arreglos florales, así como flores utilizadas para tés, infusiones, rituales religiosos, entre otros.

Secado al sol

Descripción: Es parecido al secado al aire en el sentido de que las flores se secan colgadas hacia abajo con la ayuda de hilos, cuerdas, ligas, alambres, limpiapipas etc., pero directamente expuestas al sol, para que su calor junto con el aire lleven a cabo el secado de las flores. El proceso dura de 3 a 4 días hasta la completa deshidratación.

Ventajas: es un método muy económico, ya que el material necesario es fácil de conseguir y de bajo costo. Es más

also lose their aroma and many of them get to lose or decrease the shade of their natural color [5].

Flower preservation is not a new concept. It has been used for a long time. However, one of the first techniques to preserve them was developed in 1991, starting from fresh flowers and substituting their internal humidity with polyethylene glycol [6]. From then on, a great number of techniques has been developed, which are basically grouped in two different types (1) drying or dehydrating, which consists of removing all humidity from them and (2) replacing water using aqueous substances as glycerin or polyethylene glycol; in both cases decomposition of the flower tissues is not produced since no humidity exists in their interior, avoiding growth of saprophyte organisms, such as bacteria, fungi, and so on.

A great diversity of methods and/or techniques are found in flower preservation, including foliage [4,7,8,9,10,11,12,13,14]. Some of the main reported methods are described indicating their advantages, disadvantages, and uses.

Air drying

Description: Air drying consists of hanging the flowers upside down with the help of thread, chord, rubber band, wire, pipe cleaner, etc., in a room with low environmental humidity and good air circulation, allowing flower drying to take place.

Advantages: It is a very economic method since the necessary materials are low cost and easy to find.

Disadvantages: It generally takes much time, from one to four weeks; many flowers lose their original shape due to petal or bract contraction; red and pink colors generally decrease their shade, different from blues and yellows, which are preserved.

Uses: This technique is used to preserve small flowers, such as those called as filler flower or foliage in floral arrangements, as well as those used for tea, infusion, religious rituals, among others.

Sun drying

Description: Sun drying is similar to air drying in the sense that flowers are dried hanging upside down with the help of thread, chord, rubber band, wire, pipe cleaner, etc., but directly exposed to the sun, so their heat together with air perform flower drying. The process lasts from three to four days until complete dehydration.

Advantages: It is a very economic method since the necessary material is low cost and easy to get. It is faster than air drying, which avoids the decrease in

rápido que el secado al aire, evitando que el diámetro de las flores disminuya y los pétalos se contraigan, dando un aspecto similar a las flores frescas.

Desventajas: Generalmente se utiliza en combinación con otra técnica de secado, lo que podría incrementar ligeramente los costos y el tiempo.

Usos: Ésta técnica se utiliza para preservar flores con diámetro grande y múltiple cantidad de pétalos y/o brácteas, para realizar arreglos florales.

flower diameter and petal contraction, giving an aspect similar to fresh flowers.

Disadvantages: It is generally used combined with another drying technique, which could slightly increase time and cost.

Uses: This technique is used to preserve flowers with large diameter and multiple quantity of petals and/or bracts to make flower arrangements.



Figura 1. Flores deshidratadas colocadas dentro de capelos de vidrio para evitar su rehidratación
Figure 1. Dehydrated flowers placed inside glass covers to avoid rehydration

Secado por evaporación de agua

Descripción: Es una variante de la técnica de secado al aire; a las flores recién cortadas se les retiran las hojas de los tallos y éstos se colocan en un recipiente con 2 pulgadas de agua, el contenedor se mantiene en un lugar seco, cálido y sin exponerse al sol directo durante 7 a 10 días; el agua es absorbida por la flor evaporándose hasta que ésta se seca.

Ventajas: es un método muy económico, ya que el material necesario es fácil de conseguir y de bajo costo. Esta técnica permite secar una gran variedad de flores.

Desventajas: El agua colocada en el recipiente puede contaminarse con microorganismos, lo que pudiera provocar la descomposición de los tejidos de la flor.

Usos: Ésta técnica se utiliza para preservar flores las cuales se pueden utilizar en artesanías, arreglos florales, etc.

Drying by water evaporation

Description: Drying by water evaporation is a variety of air drying technique; leaves and stems of recently cut flowers are removed and then placed in a recipient with 32 mL of water; the container is maintained in a dry and hot place without direct sun exposure for seven to 10 days. Water is absorbed by the flower, evaporating until dry.

Advantages: It is a very economic method since the necessary material is low cost and easy to get. This technique allows drying a great variety of flowers.

Disadvantages: Water placed in the recipient may be contaminate by microorganisms, which could cause decomposition of the flower tissues.

Uses: This technique is used to preserve flowers that may be used in arts and crafts, floral arrangements, etc.

Secado por presión

Descripción: Consiste en colocar las flores o el follaje entre capas de papel absorbente y aplicar presión sobre el mismo, ya sea poniéndolos bajo un material pesado o

Drying by pressure

Description: Drying by pressure consists of placing flowers or foliage between layers of absorbent paper

colocándolos en una prensa botánica. También se puede utilizar papel periódico o incluso libros cuando el material vegetal es muy pequeño; el papel absorberá la humedad que liberan los tejidos al momento de ejercer presión sobre ellos. El tiempo de secado varía pudiendo ser desde 5 días hasta 4 semanas dependiendo de la cantidad de agua que contenga el material vegetal.

Ventajas: Es un método relativamente económico, ya que se pueden secar una gran cantidad de flores en espacios reducidos. Se pueden distribuir varias flores diferentes dentro de un mismo par de capas de papel absorbente, ahorrando de esta manera espacio.

Desventajas: La humedad liberada puede originar el crecimiento de hongos ocasionando contaminación de los tejidos. Las Flores no conservan su forma original y algunas llegan a perder también su color original.

Usos: Ésta técnica se utiliza para conservar ejemplares de flores y plantas en los herbarios. Las flores se utilizan para realizar separadores de lectura, invitaciones, artesanías, etc.

Secado en horno de aire caliente

Descripción: Consiste en colocar las flores en un horno de convección a temperatura controlada en un rango que va de 30° C a 65° C y durante un tiempo que varía desde unas pocas horas hasta 4 días dependiendo de la especie y tipo de flor, así como de la cantidad de flores colocadas a la vez dentro del horno.

Ventajas: Se pueden secar varias flores en una sola carga en el horno y se puede combinar con otras técnicas de secado.

Desventajas: La principal desventaja es el alto gasto energético de algunos hornos. Las altas temperaturas aceleran el proceso de secado, pero pueden deteriorar los pigmentos de las flores y follaje tales como clorofilas, carotenos, xantofilas y antocianinas. No es una técnica apropiada para flores totalmente abiertas y con pétalos grandes.

Usos: Las flores se utilizan para realizar artesanías tales como ramos y adornos tridimensionales.

Secado en horno de microondas

Descripción: Las microondas producidas electrónicamente liberan la humedad de las flores al agitar las moléculas de agua produciendo el secado de las mismas. Las flores se pueden colocar dentro de contenedores en combinación con agentes desecadores o bien en una prensa realizada con piezas de cerámica y papel secante. En ocasiones se recomienda colocar también un contenedor con agua para prevenir el exceso de secado. El tiempo de secado varía entre 2 y 10 minutos dependiendo del tamaño y el contenido de humedad de la

aplying pressure on top, either by placing them under heavy material or in a botanical press. When the plant material is very small, newspaper or books may be used; paper absorbs humidity liberating tissues at the moment of exerting pressure on them. Drying time varies, which could be from five days up to four weeks, depending on the amount of water they contain and plant material.

Advantages: It is a relatively economic method since a large quantity of flowers can be dried in reduced spaces. Several different flowers may be distributed within the same pair of absorbent paper layers, thus saving space.

Disadvantages: The released humidity may originate fungal growth causing tissue contamination. Flowers do not preserve their original shape and some also lose their original color.

Uses: This technique is used to preserve samples of flowers and plants in a herbarium. The flowers are used to make bookmarkers, invitations, arts and crafts, etc.

Drying in hot air oven

Description: Drying in hot air oven consists of placing the flowers in a convection oven at a controlled temperature in a range from 30° to 65° C; time varies from a few hours up to four days, depending on the species and type of flower, as well as the quantity of flowers placed at the same time in the oven.

Advantages: Several flowers may be dried in one load in the oven and other drying techniques may be combined.

Disadvantages: The main disadvantage is the high energy cost of some ovens. High temperatures accelerate the drying process but may deteriorate flower and foliage pigments, such as chlorophyll, carotene, xanthophyll, and anthocyanin. It is not an adequate technique for totally open flowers and with large petals.

Uses: Flowers are used to make arts and crafts, such as bouquets and tridimensional ornaments

Drying in microwave oven

Description: Electronically-produced microwaves release flower humidity by agitating water molecules and drying them. The flowers can be placed inside containers combined with desiccating agents or in a press made with ceramic pieces and drying paper. Sometimes a container with water is recommended to prevent excess drying. Drying time varies from 2 to 10 min depending on the flower size and humidity content, obtaining the best results with resting periods from 10 min to a few hours.

flor, obteniéndose mejores resultados con periodos de reposo entre 10 minutos a unas pocas horas.

Ventajas: Debido a que el secado es muy rápido, las flores conservan mejor los colores y las formas.

Desventajas: La principal desventaja es el alto gasto energético. En el caso de las flores prensadas algunas de ellas no conservan su forma original.

Usos: Las flores se utilizan para realizar artesanías y proyectos decorativos tales como separadores de lectura, invitaciones, cuadros de naturaleza muerta y ramos.

Secado con agentes desecadores

Descripción: Se utilizan agentes que absorben la humedad de las flores, tales como arena, harina, polvo de maíz (cereal de maíz triturado), bórax, aserrín, perlita, silica gel (forma granular y porosa de dióxido de silicio [SiO₂] hecho a partir de silicato sódico), etc., solos o combinaciones entre ellos. Algunas de las combinaciones más utilizadas son: Arena + Harina de maíz (1:1) y Bórax + Polvo de maíz (1:2). En un recipiente metálico o de plástico, se coloca un poco del agente desecador o de la mezcla de ellos e inmediatamente se incrusta la flor recién cortada; posteriormente se va colocando poco a poco más cantidad de agente desecador hasta cubrirla completamente. Es importante que al ir colocando el agente desecador, se tenga cuidado de que la flor conserve su forma original. El tiempo de secado varía entre 4 y 14 días dependiendo del tamaño y cantidad de humedad que tenga la flor.

Ventajas: Algunos agentes desecadores son muy económicos y fáciles de conseguir, por ejemplo arena, harina, polvo de maíz, aserrín, entre otros. La silica gel es el agente desecador más eficiente para el secado de flores, su gran porosidad lo convierte en un excelente absorbente de agua, además, es un producto que se puede regenerar una vez saturado si se somete a una temperatura de entre 120-180 °C durante 1 hora; calentándolo desprenderá la humedad que haya absorbido, por lo que puede reutilizarse una y otra vez sin que ello afecte a la capacidad de absorción, esta solo se verá afectada por los contaminantes que posea el fluido absorbido. Otra ventaja de la silica gel es que existen versiones con compuestos que indican el grado de saturación, de manera que se puede saber cuándo es necesario secarla para seguirla utilizando a fin de conseguir un óptimo secado de las flores. Las flores conservan su forma original y la mayoría también conserva su color original.

Desventajas: La mayoría de los agentes desecadores no cuentan con indicador del grado de saturación de humedad. El precio de la silica gel es ligeramente mayor en comparación a otros agentes desecadores. Algunos pigmentos de las flores pierden su tonalidad original, sobre todo los colores rojos.

Usos: Debido a que las flores conservan su forma original, éstas se utilizan para realizar artesanías y proyectos

Advantages: Because drying is very fast, the flowers conserve color and shape better.

Disadvantages: The main disadvantage is the high energy expenditure. In the case of pressed flowers, some of them do not retain their original shape.

Uses: The flowers are used to create arts and crafts and decoration projects, such as bookmarks, invitations, still life portraits and bouquets.

Drying with desiccator agents

Description: Desiccator agents, such as sand, flour, cornstarch (ground corn), borax, sawdust, perlite, silica gel (granular and porous silicon dioxide [SiO₂] made starting from sodium silicate), etc., absorb flower humidity alone or combined among them. Some of the most used combinations are sand + cornstarch (1:1) and borax + corn flour (1:2). A bit of desiccator agent or a mixture is placed in a metallic or plastic recipient and the recently cut flower is immediately set; subsequently, little by little more quantity of the desiccator agent is added until the flower is covered completely. It is important to carefully observe that the flower conserves its original form when the desiccator agent is placed. Drying time varies from four to 14 days depending on the size and humidity quantity of the flower.

Advantages: Some desiccating agents are very economic and easy to get, for example, sand, flour, cornstarch, sawdust, among others. Silica gel is the most efficient desiccator agent for drying flowers. Its great porosity turns it into an excellent water absorbent. It is also a product that can regenerate, once saturated, if subjected to a temperature from 120-180°C for one hour; heating depends on the humidity absorbed, which is why it can be reused once or twice without affecting its absorption capacity. It is only affected by contaminants that have absorbed the fluid. Another advantage of silica gel is that some versions have compounds indicating the saturation degree, so it is possible to know when to dry it and continue using it until an optimum flower drying is achieved. The flowers retain their original shape, and the majority also retain their original color.

Disadvantages: Most of the desiccator agents do not have a humidity saturation degree indicator. The cost of silica gel is slightly higher compared with other desiccator agents. Some flower pigments lose their original shade, above all red colors.

Uses: Because flowers preserve their original form, they are used to make arts and crafts and tridimensional decoration projects, such as bouquets and flower arrangements.

decorativos tridimensionales tales como ramos y arreglos florales.

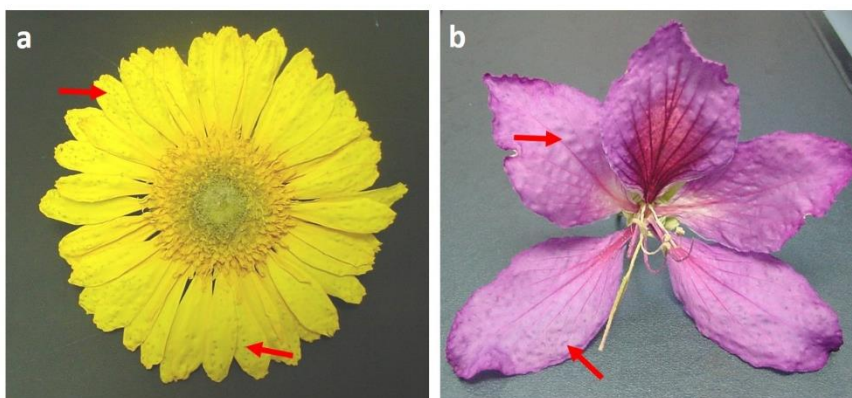


Figura 2. Marcas dejadas en flores deshidratadas con esferas de silica gel de 1 - 3 mm de diámetro. **a)** Flor de Gerbera. **b)** Flor de Bauhinia.

Figure 2. Marks left in dehydrated flowers with silica gel spheres of 1 - 3 mm in diameter. **(a)** Gerbera flower; **(b)** Bauhinia flower.

Secado por liofilización

Descripción: También conocido como secado en frío. Es el método más efectivo, se basa en el principio de sublimación, en primer lugar, se congelan las flores a muy bajas temperaturas (menos de 0° C) de forma rápida, evitando que se formen grandes cristales de hielo, posteriormente se someten a un proceso de vacío (menos de 4.58 torr) para que el agua se evapore sin pasar por el estado líquido. Este proceso toma varios días.

Ventajas: La ausencia de agua en estado líquido durante el proceso evita que ocurran reacciones químicas indeseables, por lo que las flores conservan su forma natural, textura y color, e incluso se menciona que pueden conservar la fragancia.

Desventajas: Los equipos liofilizadores generalmente son muy caros y se necesita capacitar a personal para su utilización.

Usos: Las flores se utilizan para realizar artesanías y proyectos decorativos tales como encapsulado en resinas, ramos, arreglos florales, etc.

Preservado con glicerina

Descripción: La glicerina preserva las flores y el follaje reemplazando la humedad natural de los tejidos. Se utiliza una mezcla de 1 parte de glicerina y dos partes de agua tibia, manteniéndose las muestras sumergidas a una profundidad de 5 a 7 cm; el proceso toma de 6 a 7 días dependiendo de la cantidad de agua que tengan las muestras frescas.

Ventajas: Es un método económico, el material necesario es barato y fácil de conseguir. El follaje preservado de esta manera conserva flexibilidad y brillantez, así como su forma

Drying by lyophilization

Description: Drying by lyophilization is also known as cold drying. This method is the most effective and based on the principle of sublimation. First, flowers are frozen rapidly at very low temperatures (less than 0° C) to avoid large ice crystals forming; subsequently, flowers are subjected to a vacuum-pack process (less than 4.58 Torr), so water evaporates without passing through the liquid state. This process takes a couple of days.

Advantages: Water absence in the liquid state during the process avoids undesirable chemical reactions to occur, which is why flowers conserve their natural shape, texture, including the possibility of preserving fragrance.

Disadvantages: Lyophilizers are generally very expensive and need training staff for its use.

Uses: Flowers are used to make arts and crafts and decoration projects such as encapsulated in resin, bouquets and floral arrangements, etc.

Preserving using glycerin

Description: Glycerin preserves flowers and foliage replacing natural humidity in tissues. A mixture of one part of glycerin and two parts of warm water is used; samples are maintained submerged at a depth of 5 to 7 cm; the process takes from six to seven days dependent on the amount of water the fresh samples have.

original por varios años, eliminando características indeseables como la contracción y flacidez de los tejidos.

Desventajas: La glicerina es un medio que permite el crecimiento de microorganismos, por lo que es recomendable agregar compuestos que inhiban su crecimiento tales como antibióticos, plata coloidal, etc. Generalmente no se utiliza para preservar flores, ya que éstas no conservan su color original.

Usos: El follaje se utiliza en artesanías y en proyectos decorativos como separadores, invitaciones, cuadros de naturaleza muerta, veladoras, magnetos para refrigerador, encapsulados y para colocar follaje a los ramos de flores deshidratadas con otras técnicas.

Advantages: It is an economic method; the necessary material is inexpensive and easy to get. The foliage preserved in this manner conserves flexibility and brilliantness, as well as its original shape for several years, eliminating undesirable characteristics, such as contraction and tissue flaccidity.

Disadvantages: Glycerin is a medium that allows microorganism growth, which is why compounds inhibiting their growth should be added, such as antibiotics, colloidal silver, etc. This technique is not generally used to preserve flowers since they do not maintain their original color.

Uses: Foliage is used in arts and crafts and in decoration projects, such as bookmarkers, invitations, still nature portraits, candles, refrigerator magnets, encapsulation, and place foliage in dehydrated flower bouquets made with other techniques.



Figura 3. Pétalo de rosa deshidratado recuperando el color rojo después de agregar unas gotas de ácido clorhídrico 1N

Figure 3. Dehydrated rose petals recovering red color after adding some drops of 1N hydrochloric acid.

Consideraciones importantes:

- Es importante que las flores (y follaje) que se van a preservar por cualquiera de las técnicas mencionadas, se corten (se separen de la planta madre) e inmediatamente se sometan a las técnicas, a fin de que la pérdida de humedad (y por lo tanto de la forma original) debida al corte sea mínima.
- A fin de obtener mejores resultados, se pueden combinar varias técnicas de secado por ejemplo, los contenedores con flores en silica gel se pueden colocar en un horno de secado.
- Después de aplicar cualquier técnica de secado, es importante evitar la rehidratación de las flores debido a

Important considerations:

- The flowers and foliage to be preserved by any of the mentioned techniques should be cut – separating them from the mother plant – and immediately subject them to any of the techniques, so humidity loss, including original shape due to cutting, be minimum.
- With the purpose of obtaining better results, several drying techniques may be combined. For example, the containers with flowers in silica gel may be placed in a drying oven.

la humedad del medio ambiente, para lo cual se pueden cubrir con laca, barniz o parafina; también se pueden colocar dentro de recipientes cerrados, en capelos de vidrio (Figura 1), preferentemente acompañados con una bolsita de silica gel.

- Para evitar que las esferas de silica gel dejen marcas en las flores (Figura 2), es recomendable emplear esferas con menor diámetro, por ejemplo de 0.5 - 1 mm de diámetro, en lugar de esferas de 1 - 3 mm de diámetro, de esta manera las marcas serán menos visibles. También es recomendable siempre utilizar silica gel con indicador de grado de saturación, sin embargo, debido a que presenta un mayor costo, se sugiere mezclar esferas de silica gel sin indicador con algunas pocas esferas con indicador, de esta manera, éstas últimas nos permitirán conocer el grado de saturación de humedad de toda la mezcla.
- Generalmente los colores que más se pierden son los colores rojos tornándose en coloraciones rojo muy oscuro o marrón; para recuperar éstas coloraciones, se pueden asperjar soluciones diluidas de algún ácido (Figura 3).
- After applying any drying technique, flower rehydration due to environmental humidity should be avoided. Flowers may be covered with lacquer, varnish or paraffin. They may also be placed inside closed recipients, for example, glass cover (Figure 1), preferably together with a silica gel bag.
- To avoid silica gel spheres leaving spots in flowers (Figure 2), smaller ones are recommended, for example, 0.5 - 1 mm instead of 1 - 3 mm in diameter. In this manner, marks are less visible. Moreover, silica gel should always be used with a saturation degree indicator. Because this option is more costly, silica gel spheres without indicator can be mixed with those with indicator. Thus, these last ones should allow knowing the humidity saturation degree of all the mixture.
- Generally the colors that are lost are reds, which turn into very dark red or brown; to recover coloration, diluted sprays of some acid may be sprayed (Figure 3).

Referencias References

1. Adebayo IA, Pam VK, Arsad H *et al.* (2021) The Global Floriculture Industry: Status and Future Prospects. In: Hakeem KR (ed) The Global Floriculture Industry: Shifting Directions, New Trends, and Future Prospects, Apple Academic Press Inc. CRC Press, USA, pp. 1-14.
2. García VCA, Jiménez MEJ, León GSA *et al.* (2009) Disposiciones normativas de comercio exterior en México y su aplicación: La floricultura en México, un reto a la exportación. Tesis de Licenciatura, Escuela superior de comercio y administración, Unidad Tepepan, Instituto Politécnico Nacional, 204 p.
3. Aragón VS, Pantaleón GE (2019) Rosas de corte del Estado de México, exportación a Canadá. Tesis de Licenciatura, Centro Universitario Nezahualcóyotl, Universidad Autónoma del Estado de México, 94 p.
4. Koley P (2020) An overview of dehydration techniques. *J Pharmacogn Phytochem* 9(4):228-233.
5. Ito H, Hayashi T, Hashimoto M, *et al.* (2010) A Protocol for Preparing Preserved Flowers with Natural Color and Texture. *Horttechnology* 20(2):445-448.
6. De Winter-Scailteur N (1991) Long-life cut flowers and method of treatment for obtaining same. WO91/03160. European Patent Office, Munich, Germany.
7. Kumar S, Malik A, Hooda V (2021) Drying of flowers: A money-spinning aspect of floriculture industry. *J Pharmacogn Phytochem* 10(1):27-31.
8. Jain R, Janakiram T, Kumawat GL (2016) Drying techniques in ornamental plants. In: Commercial Horticulture (Eds.) New India Publishing Agency, New Delhi, pp. 501-512.
9. Rani PR, Reddy MV (2015) Dehydration techniques for flowers. *Int J Appl Res* 1(10):306-311.

10. Kant K (2018) Drying techniques for preservation of ornamental parts of plant. *Int J Sci Environ Technol* 7(5):1650-1654.
11. Raval R, Jayswal S, Maitrey B (2020) Drying Techniques of Selected Flowers-A Review. *IJRASET* 8(VI):1608-1611.
12. Datta SK (2016) Dehydration of flowers and foliage and floral craft. *Everyman's Science*, Vol. LI No. 4 (October-November) 224-228.
13. Sharavani CSR, Sree GD (2018) Dry Flowers–A Boon to Floriculture Industry. *J Postharvest Technol* 6(3):97-108.
14. Singh A, Laishram N (2010) Drying of flowers and other ornamental plant parts in India. *Floriculture Ornamental Biotech* 4(1):72-78.

Capítulo VII

Técnicas Avanzadas de Biología Molecular y su Aplicación en los Cultivos

Advanced Molecular Biology Techniques and their Application in Crops

Julio A. Massange-Sánchez^{1*}

¹Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México, CP 45019. *Autor de correspondencia: jmassange@ciatej.mx

Introducción

La calidad y producción agrícola sostenible es un tema importante debido al aumento de la población mundial (9.7 billones de personas en el 2050) y el calentamiento global. Esto implica que es necesario incrementar la producción agrícola para alimentar a toda la población en las siguientes décadas, ya sea por la expansión de tierras arables, o por el incremento en el rendimiento de la producción. Además, de generar plantas más resistentes a condiciones ambientales adversas, particularmente, cuando varios tipos de estrés ocurren en combinación, teniendo un efecto devastador sobre el crecimiento y productividad de las plantas [1]. Las herramientas biotecnológicas han sido empleadas para generar cultivos con estas características, ya que proveen precisión, fiabilidad y reducen el ciclo de mejoramiento en cultivos de larga duración.

El mejoramiento de variedades de plantas o fitomejoramiento, ha sido utilizado por los humanos desde hace 10,000 años, seleccionando de manera visible los fenotipos que facilitaban la cosecha y el incremento de la producción, dando lugar a la domesticación de las primeras variedades de cultivos Figura 1 [2]. En el siglo XIX, avances en los principios de hibridación y selección descritos por Darwin y la asociación entre fenotipo y genotipo hechas por Mendel establecieron las bases del fitomejoramiento tradicional Figura 1 [3]. Posteriormente, avances en el entendimiento de la biología vegetal, inducción de la variación genética, citogénesis, genética cuantitativa, biología molecular, genética, biotecnología y las ciencias “ómicas” han sido exitosamente aplicadas para el fitomejoramiento de especies de interés comercial Figura 1 [4]. Recientemente, los avances en la edición de genomas en regiones específicas proporcionan la capacidad de modificar con precisión características deseables en los cultivos [5].

El objetivo de este manual es describir las técnicas más avanzadas de la biología molecular que son implementadas en el fitomejoramiento de cultivos. En este contexto, se puede identificar cuatro épocas principales del fitomejoramiento 1) el fitomejoramiento basado en la selección de variantes observadas, sin conocer su origen 2)

Introduction

Sustainable agricultural and quality production is an important topic because of world growth population (9.7 billion people by 2050) and global warming. These factors imply the need of increasing agriculture production to feed the whole population in the next decades, either by arable land expansion or increasing yield production. Additionally, resistant plants to adverse environmental conditions should be cultivated, particularly when several types of stress occur in combination with a devastating effect on plant growth and productivity [1]. Biotechnological tools have been used to generate cultivars with those traits, since they provide precision, feasibility and reduce the improvement cycle of long-term cultivation.

Plant variety improvement or plant breeding was used by humans 10 000 years ago, selecting visual phenotypes that made harvesting easier, increasing production and giving rise to the domestication of the first crop varieties (Figure 1) [2]. In the 19th century, advances in hybridation and selection principles described by Darwin and the association between phenotype and genotype made by Mendel, established the bases of traditional plant breeding (Figure 1) [3]. Subsequently, advances in knowledge of plant biology, induction of genetic variation, cytogenesis, quantitative genetics, molecular biology, genetics, biotechnology and omic sciences have been successfully applied for species plant breeding of commercial interest (Figure 1) [4]. Recently, advances in genome edition in specific regions provide the capacity to modify desirable characteristics in crops with edition precision [5].

Therefore, the objective of this handbook is to describe the most advanced techniques of molecular biology, which are implemented in crop plant breeding. In this context, four main stages can be identified. Plant breeding is based on (1) selection of varieties observed without knowing their origin; (2) generation and selection of genetic variation by controlled breeding; (3) genetic variation and selection of specific

fitomejoramiento basado en la generación y selección de la variación genética mediante el cruzamiento controlado 3) fitomejoramiento basado en el monitoreo de la variación genética y selección de recombinantes específicas 4) el fitomejoramiento basado en la creación e introducción variación genómica novedosa en los genomas a través de la ingeniería genética.

recombinants; (4) creation and introduction of novel genomic variation through genetic engineering.

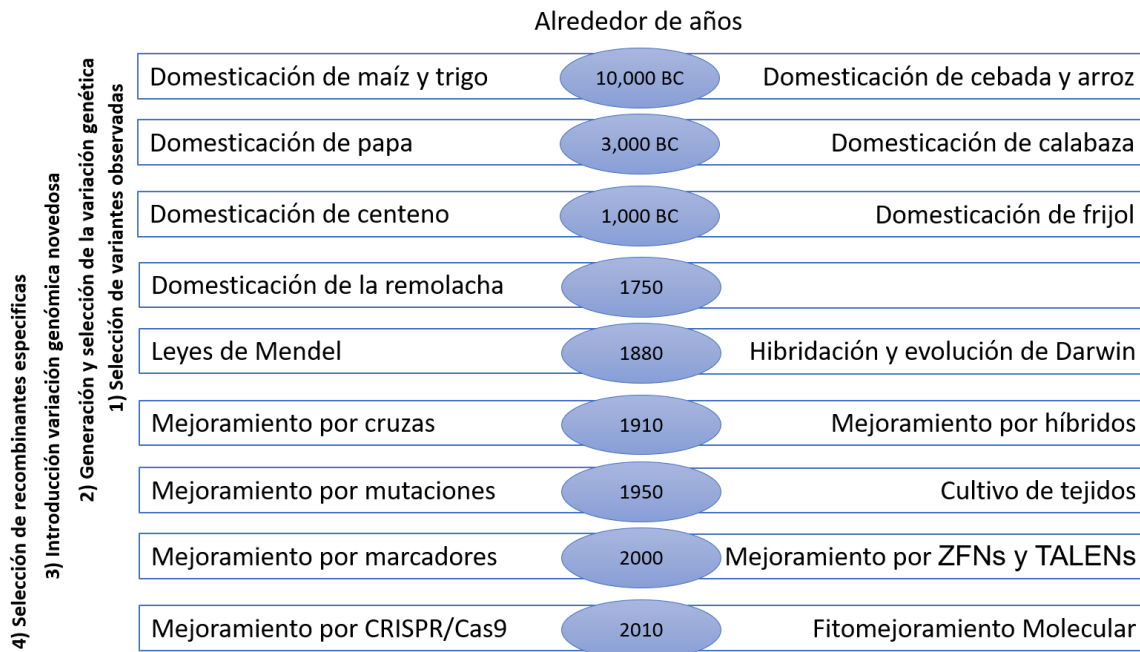


Figura 1. Línea del tiempo de los hallazgos más relevantes en fitomejoramiento.
Figure 1 Time line of the most relevant plant breeding findings.

Fitomejoramiento basado en la selección de variantes observadas

Plant breeding based on selection of observed variations

La forma más primitiva del fitomejoramiento fue la selección de variantes naturales en la naturaleza, que más tarde se llevó al campo. La mayoría de los cultivos fueron domesticados hace ≈10,000 años, en la cual se incluye los cereales más productivos de la actualidad: maíz, trigo, cebada y arroz [6,7]. La variación genética fue constantemente sometida a la presión de selección de ciclos siembra/cosecha y recolección de alimentos. En algunos casos, este proceso dio como resultado en grandes cambios en el fenotipo de la planta, por ejemplo, la derivación del maíz a partir del teosinte o el arroz (*Oryza sativa*) a partir de *Oryza rufipogon* [8]. Otro ejemplo, basado en la selección de variantes observadas es el origen de las razas. Las razas son poblaciones de plantas que han sido cultivadas por muchas generaciones en una cierta región, que tiene condiciones particulares; cierto tipo de estrés biótico y abiótico, manejo

The most primitive form of plant breeding was natural selection variation, which was later taken to the field. The majority of the crops were domesticated ~10 000 years ago, of which the most productive cereals are included: corn, wheat, barley, and rice [6,7]. The generic variation was constantly subjected to selection pressure of sowing/harvesting cycles and food recollection. In some cases, this process resulted in great changes in plant phenotype. For example, maize derived starting from teosinte or rice (*Oryza sativa*) from *Oryza rufipogon* [8]. Another example based on selection of the variants observed is the origin of race. Races are plant populations that have been cultivated by many generations in a certain region that has particular conditions: a certain type of biotic or abiotic stress, crop and seed management and food preferences.

de cultivo, manejo de semilla y preferencias alimenticias. Estas son entidades genéticamente diversas; continuamente cambiando como consecuencia de selección intencional y no intencional por la mezcla de semilla y el intercambio de polen. Las razas son una mezcla entre una "selección estabilizada" y una "selección direccionada" que pretende mantener la identidad de una raza en una localidad con ajustes pequeños para la adaptación a cambios ambientales. En la actualidad las razas pueden dar origen a cultivos modernos [9].

El primer método de fitomejoramiento basado en un conocimiento básico de las leyes de la herencia fue la selección de plantas dentro de las razas. Este se basó en el supuesto de que las progenies de los mejores individuos sean superiores a la progenie de individuos aleatorios dentro de una población. Este hecho puede ser considerado como el origen del paradigma de la homogeneidad que domina el fitomejoramiento hasta el día de hoy. En el caso de especies autopolinizantes, como arroz y trigo, las razas locales pueden ser una mezcla de líneas puras, incluyendo algunos individuos heterocigotos derivados de una baja frecuencia de polinización cruzada. En este tipo de población, la selección de plantas individuales y la deriva de estas progenies da como resultado que algunas líneas superen el crecimiento/rendimiento de razas locales en una región específica [9].

Fitomejoramiento basado en la generación y selección de la variación genética

A pesar de la gran diversidad genética que se puede encontrar en las razas, la sencilla aplicación de la selección en la diversidad preexistente eventualmente llega al límite. Dada el gran número de posibilidades que resultan de la cruce de diversos padres, el paso limitante para la ganancia genética empieza con la capacidad del programa de fitomejoramiento para evaluar un largo número de plantas, derivado de un largo número de cruces [10].

La gran mayoría de los cultivares de especies autopolinizadas liberadas hoy en día, han sido desarrolladas a través del método de pedigrí. El fitomejoramiento por pedigrí consiste en el cruzamiento de padres y la generación de poblaciones segregantes, las cuales se llevan a través de varias generaciones de autopolinización y selección, hasta un grupo de líneas derivadas que combinan y obtienen las buenas características de los padres. Debido a que este método es basado en la complementación de rasgos es muy eficiente para el mejoramiento de características de cualitativas como la resistencia a enfermedades, arquitectura, color y formas de la parte de las plantas. Una desventaja de este método es el hecho que el rendimiento es evaluado eficientemente hasta el final del proceso en líneas derivadas, cuando las semillas están disponibles para ensayos replicados [11].

They are genetically diverse entities, continuously changing as a consequence of intentional or not for seed mixture and pollen exchange. Races are a mixture between a "stabilized selection" and "directional selection" that intends maintaining race identity in a locality with small adjustments to adapt to environmental changes. Currently, races may give origin to modern crops [9].

The first plant breeding method based on basic knowledge of the laws of heredity was plant selection within races, which assumes that progenies of the best individuals are higher in the progeny of aleatory individuals within a population. This fact may be considered as the origin of the homogeneity paradigm that dominates plant breeding up to now. In the case of self-pollinating species, such as rice and wheat, local races may be a mix of pure lines, including some heterozygous individuals that derived from a low crossed pollination frequency. In this type of population, individual plant selection and those derived from these progenies give as a result that some lines go beyond growth/yield of local races in a specific region [9].

Plant breeding based on generation and genetic variation selection

Despite the great genetic diversity that can be found in races, the single selection application in preexisting diversity eventually comes to a limit. Given that a great number of possibilities result from breeding diverse parents, the limiting step for genetic profit starts from the capacity of a plant breeding program to evaluate a large number of plants, deriving from a large number of breeding [10].

The great majority of self-pollinating cultivar species released nowadays have been developed by the pedigree method. Pedigree plant breeding consists of breeding parents and segregating populations, which are held throughout several self-pollinating, and selection techniques up to a derived group of lines that combine and obtain the good characteristics of the parents. Because this method is based on complementary features, it is very efficient for improving qualitative characteristics, such as resistance to diseases, architecture, color and shape of a plant part. A disadvantage of this method is the fact that yield is assessed until the end of the process in derived lines when seeds are available for replicate experiments [11].

In modern plant breeding populations, the objective is to increase the population value as a source of elite lines. Heterosis is the superiority of individual hybrid vigor compared with derived individuals. Within certain limits, if the parents have greater divergence, the

En poblaciones de fitomejoramiento modernas, el objetivo es aumentar el valor de la población como una fuente de líneas elite. Heterosis es la superioridad de híbridos individuales comparados con derivados individuales. Dentro de ciertos límites, si los padres tienen mayor divergencia, el grado de heterosis es mayor en las nuevas generaciones. El vigor híbrido disminuye rápidamente a través de las generaciones que se autopolinizan indicando que cualquiera que sea el mecanismo de la heterosis este disminuye debido a la presencia de *locus* heterocigotos [12].

Fitomejoramiento basado en el monitoreo de la variación genética y selección de recombinantes específicas

Los métodos de fitomejoramiento tradicional fueron basados en la complementariedad entre las características de los parentales. Sin embargo, poco o nada se sabía acerca de la parte del genoma que venía de cada padre. Esta situación cambió con la llegada y disminución de la tecnología de los marcadores moleculares, los cuales hicieron posible el monitoreo de la transmisión de segmentos de cromosomas en la progenie [9].

Los marcadores moleculares son herramientas esenciales para estudiar el control genético de cualquier característica de interés, eventualmente dirigidas a la identificación de genes responsable de la característica, esta área es denominada como Biología Molecular y revolucionó las ciencias biológicas en décadas pasadas [13].

Cuando muchos marcadores moleculares están genotipados en un grupo de plantas derivadas de una sola cruce, la frecuencia de recombinación entre ellos puede ser usado para inferir el orden y la relativa distancia en los cromosomas, resultando en un mapa genético. Si estas plantas o sus progenies son evaluadas para una característica cuantitativa, se puede construir un modelo estadístico en el que la variancia fenotípica puede ser explicada por alguna de los marcadores, lo cual implica que esos marcadores deben estar ligados a los genes responsables de las características. Este enfoque se llama mapas QTL (por sus siglas en inglés, *Quantitative Trait Loci*), que son normalmente el primer paso para entender el control genético de una característica cuantitativa. El resultado final es la identificación del gen y el polimorfismo en la secuencia de nucleótidos responsable por las diferencias fenotípicas observadas [14].

Recientes avances en la tecnología de genotipo ha reducido los costos para genotipar, creando la posibilidad de monitorear miles de marcadores en una población de plantas bajo selección. En este escenario los fitomejoradores tienen una gran cantidad de datos con una relación desconocida de cada marcador con características fenotípicas. La técnica genómica de selección propone que la relación entre marcadores y genes específicos puede ser utilizado para producir un "valor de fitomejoramiento" sin necesidad de evaluar el fenotipo, usando modelos

degree of heterosis is greater in new generations. Hybrid vigor decreases rapidly through self-pollinating generations indicating that whichever heterosis mechanism is, it decreases due to the presence of heterozygous *locus* [12].

Plant breeding based on genetic variation tracking and specific recombinant selection

Traditional plant breeding methods were based on complementarity between parental characteristics. However, very little or nothing was known about the genome part that came from each parent. This situation changed with molecular marker technology, which made monitoring chromosome segment transmission in progeny possible [9].

Molecular markers are essential tools to study the genetic control of any characteristic of interest, eventually directed to identifying the genes responsible for the specific characteristic. This field is called Molecular Biology and has revolutionized biological sciences in past decades [13].

When many molecular markers are genotyped in a group of plants deriving from one breed only, the recombination frequency among them may be used to infer order and relative distance in the chromosomes, resulting in a genetic map. If these plants or their progenies are evaluated for a quantitative characteristic, a statistical model may be constructed, in which the phenotypic variance may be explained by any of the markers. Thus, these markers imply to be linked to the genes responsible for those characteristics. This approach is called *Quantitative Trait Loci* (QTL), which is usually the first step to understand the genetic control of a quantitative characteristic. The final result is gene identification and polymorphism in the nucleotide sequence responsible for the phenotypic differences observed [14].

Recent advances in genotype technology have reduced costs for genotyping, creating the possibility of monitoring thousands of markers in a plant population under selection. In this scenario plant breeders have a great number of data with an unknown relationship of each marker with phenotypical characteristics. The genomic selection technique proposes that the relationship between specific genes and markers may be used to produce a plant breeding value without the need of assessing the phenotype, using statistical models in a training population for which all the genotypes and phenotypes have been recorded [13]. Genomics selection may be used to accelerate plant breeding in crop yield, which is frequently considered as the most difficult characteristic to assist. Currently, large seed

estadísticos en una “población de entrenamiento” para la cual todos los genotipos y fenotipos han sido anotados [13]. La genómica de selección puede ser usada para acelerar el fitomejoramiento en el rendimiento de los cultivos, el cual es frecuentemente considerado como la característica más difícil de asistir. En la actualidad, grandes compañías en producción de semillas están invirtiendo en el análisis de secuenciación masiva y bioinformática para hacer la integración de genómica de selección en programas de fitomejoramiento.

Fitomejoramiento basado en la creación e introducción de variación genómica novedosa en los genomas

Mas allá de la tecnología de marcadores moleculares, la tecnología de edición de genomas usando la ingeniería de endonucleasas son muy populares hoy en día. En esta se incluyen las tecnologías que usan “Zinc Finger Nucleases” (ZFNs) y la “Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs)”, las cuales son capaces de generar modificaciones genómicas de una manera razonablemente fácil y accesible. La más avanzada tecnología para interrumpir una doble cadena de ADN es la popularmente conocida como el sistema “CRISPR/Cas9”. CRISPR/Cas9 significa “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/associated protein 9” [5].

La tecnología CRISPR/Cas9 funciona produciendo una guía de RNA (alrededor de 18-20 nucleótidos) que se une a una secuencia blanco de DNA, en donde la enzima Cas9 corta en una posición de 3-4 nucleótidos adyacente al sitio PAM (proto spacer motif 3), posteriormente el sistema se regenera produciendo deleciones e inserciones que producen alteraciones en el gen blanco. Es importante mencionar que existen seis distintos tipos de esta tecnología (I, II, III, IV, V y VI), pero el tipo II es la más ampliamente utilizada [15]. Muchas plantas han sido sometidas a la edición de genomas, algunos ejemplos de mejoramiento de cultivos se muestran en la Tabla 1.

production companies are investing in massive sequence analyses in plant breeding programs.

Plant breeding based on creation and introduction of novel genomic variation

Beyond molecular marker technologies, genome editing technology using endonuclease engineering is very popular nowadays, which include technologies that use “Zinc Finger Nucleases” (ZFNs) and “Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs)”, capable of generating genomic modifications in a reasonably easy and accessible way. The most advanced technology to interrupt a double chain DNA is commonly known as “CRISPR/Cas9” system. CRISPR/Cas9 means Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/associated protein 9 [5].

The CRISPR/Cas9 technology functions producing an RNA guide (~18-20 nucleotides) that links to the target DNA sequence, in which the Cas9 enzyme cuts into a position of 3-4 nucleotides adjacent to the PAM (proto spacer motif 3) site. Subsequently, the system regenerates producing deletions and insertions that produce alterations in the target gene. It is important to mention that six different types of this technology exist (I, II, III, IV, V y VI), but Type II is the most widely used [15]. Many plants have been subjected to genome edition. Some examples of crop improvement are shown in Table 1.

Tabla 1. Ejemplos de cultivos que han sido mejorados mediante la edición de genomas
Table 1. Examples of crops that have been improved by genome edition

Cultivo	Tecnología	Genes	Característica mejorada	Referencia
Maíz	ZFNs	ZmIPK1	Tolerante a herbicida	16
Arroz	TALENs	OsSWEET14	Resistencia al Tizón bacteriano	17
Trigo	TALENs	TaMLO	Resistencia al moho polvoriento	18
Azúcar de caña	TALENs	COMT	Mejoramiento de la composición de la pared celular	19
Papa	TALENs	VInv	Minimizar la reducción de azúcar	20
Arroz	CRISPR/Cas9	Gnla1, GS3, DEP1	Numero de grano, longitud de grano, panículas densas erectas	21
Tomate	CRISPR/Cas9	SIMLO1	Resistencia al moho polvoriento	22
Naranja	CRISPR/Cas9	Promotor CsLOB1	Resistencia al cancro de los cítricos	23
Calabaza	CRISPR/Cas9	eIF4E	Resistencia a virus	24
Arroz	CRISPR/Cas9	OsMATL	Inducción de haploidía en plantas	25
Maíz	CRISPR/Cas9	ARGOS8	Resistencia a sequia	26
Papa	CRISPR/Cas9	Wx1	Alto contenido de amilopectina	27

Desafortunadamente, el desarrollo de nuevas variedades a través de la edición de genomas ha sido retrasada por ser considerada una técnica que genera organismos genéticamente modificados, incluso aunque esté libre de transgenes.

Unfortunately, the development of new varieties through genome edition has been delayed because it has been considered a technique that generates genetically modified organisms, even those transgene-free.

Referencias References

1. Araus JL, Slafer GA, Royo C, *et al.* Breeding for yield potential and stress adaptation in cereals. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 2008;27: 377–412. doi:10.1080/07352680802467736
2. Jain S *Crops Man.* 2nd ed.(1992) By Jack R. Harlan. American Society of Agronomy, 677 S. Segoe Road, Madison, WI 53711. 284 pp. \$34 hardcover. *Am J Altern Agric.* 8: 47–48. doi:10.1017/S0889189300004938
3. Fairbanks DJ, Mendel, Darwin (2020) untangling a persistent enigma. *Heredity (Edinb).;*124: 263–273. doi:10.1038/s41437-019-0289-9
4. Mohan Jain S, Brar DS, (2009) *Molecular techniques in crop improvement: 2nd edition.* Molecular Techniques in Crop Improvement: 2nd Edition. doi:10.1007/978-90-481-2967-6
5. Fichtner F, Urrea Castellanos R, Ülker B. (2014) Precision genetic modifications: A new era in molecular biology and crop improvement. *Planta* 239: 921–939. doi:10.1007/s00425-014-2029-y
6. Meyer RS, Purugganan MD (2013) Evolution of crop species: Genetics of domestication and diversification. *Nat Rev Genet.*14: 840–852. doi:10.1038/nrg3605
7. Feuillet C, Langridge P, Waugh R. (2007) Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends Genet.* 2008;24: 24–32. doi:10.1016/j.tig. 11.001
8. Chen Q, Li W, Tan L, Tian F (2020) Harnessing Knowledge from Maize and Rice Domestication for New Crop Breeding. *Mol Plant.* 2021;14: 9–26. doi:10.1016/j.molp. 12.006
9. McNally KL, Childs KL, Bohnert R, *et al.* (2009) Genomewide SNP variation reveals relationships among landraces and modern varieties of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 12273–12278. doi:10.1073/pnas.0900992106

10. Rasmusson DC, Phillips RL. (1997) Plant Breeding Progress and Genetic Diversity from De Novo Variation and Elevated Epistasis. *Crop Sci.* 37: cropsci1997.0011183X003700020001x. doi:https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700020001x
11. Breseghello F, de Moraes OP, Pinheiro PV, *et al.* (2011) Results of 25 Years of Upland Rice Breeding in Brazil. *Crop Sci.* 51: 914–923. doi:https://doi.org/10.2135/cropsci2010.06.0325
12. Shull GH. (1948) What Is “Heterosis”? *Genetics.* 33: 439–446.
13. Nadeem MA, Nawaz MA, Shahid MQ, *et al.* (2018) DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 32: 261–285. doi:10.1080/13102818.2017.1400401
14. Price AH. (2006) Believe it or not, QTLs are accurate! *Trends Plant Sci.* 11: 213–216. doi:10.1016/j.tplants.2006.03.006
15. Dheer P, Rautela I, Sharma V, *et al.* (2020) Evolution in crop improvement approaches and future prospects of molecular markers to CRISPR/Cas9 system. *Gene* 753: 144795. doi:10.1016/j.gene.2020.144795
16. Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, *et al.* (2009) Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature.* 459: 437–441. doi:10.1038/nature07992
17. Li T, Liu B, Spalding MH, *et al.* (2012) High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature biotechnology.* United States; pp. 390–392. doi:10.1038/nbt.2199
18. Wang Y, Cheng X, Shan Q, *et al.* (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol.* 32: 947–951. doi:10.1038/nbt.2969
19. Jung JH, Altpeter F. (2016) TALEN mediated targeted mutagenesis of the caffeic acid O-methyltransferase in highly polyploid sugarcane improves cell wall composition for production of bioethanol. *Plant Mol Biol.* 92: 131–142. doi:10.1007/s11103-016-0499-y
20. Clasen BM, Stoddard TJ, Luo S, *et al.* (2016) Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol J.* 14: 169–176. doi:10.1111/pbi.12370
21. Li M, Li X, Zhou Z, *et al.* (2016) Reassessment of the Four Yield-related Genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in Rice Using a CRISPR/Cas9 System. *Front Plant Sci.* 7: 377. doi:10.3389/fpls.2016.00377
22. Nekrasov V, Wang C, Win J, *et al.* (2017) Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci Rep.* 7: 482. doi:10.1038/s41598-017-00578-x
23. Peng A, Chen S, Lei T *et al.* (2017) Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. *Plant Biotechnol J.* 2017;15: 1509–1519. doi:10.1111/pbi.12733
24. Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, *et al.* (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol Plant Pathol.* 17: 1140–1153. doi:10.1111/mpp.12375
25. Yao L, Zhang Y, Liu C, *et al.* (2018) *OsMATL* mutation induces haploid seed formation in indica rice. *Nat Plants.* 4: 530–533. doi:10.1038/s41477-018-0193-y
26. Shi J, Gao H, Wang H, *et al.* (2017) *ARGOS8* variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol J.* 15: 207–216. doi:10.1111/pbi.12603
27. Andersson M, Turesson H, Nicolia A, *et al.* (2017) Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep.* 36: 117–128. doi:10.1007/s00299-016-2062-3

Capítulo VIII

Herramientas Biotecnológicas para el Mejoramiento Genético de Plantas Ornamentales, con Énfasis en la Poliploidización

Biotechnological Tools for Genetic Improvement of Ornamental Plants with Emphasis on Polyploidization

Rodrigo Barba González^{1*}

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México, CP 45019. * Autor correspondencia: rbarba@ciatej.mx

Introducción

El mejoramiento genético consiste básicamente en generar nuevas variedades, que sean más productivas y resistentes a factores bióticos, como hongos y bacterias que les causan enfermedades y a factores abióticos, como altas temperaturas o heladas. En el mejoramiento genético de plantas ornamentales no basta con generar variedades más productivas o resistentes, sino que es necesario desarrollar variedades nuevas y diferentes a las existentes. La industria de las plantas ornamentales se caracteriza por su gran diversidad. Actualmente hay más especies ornamentales cultivadas que todos los cultivos agrícolas y hortícolas combinados. Existe un continuo desarrollo de tecnologías para introducir versiones mejoradas de flores ya conocidas, así como nuevas especies desconocidas como ornamentales [1]. Por esta razón, cada vez se buscan y seleccionan más plantas nativas con características ornamentales adecuadas [2]. Para competir globalmente se requieren productos superiores, nuevas variedades o especies únicas.

Mejoramiento genético

Para iniciar un programa de mejoramiento genético es imprescindible conocer si se pretende iniciar el mejoramiento desde cero, es decir, con una especie silvestre o si se pretende mejorar un cultivar existente. El objetivo final de un programa de mejoramiento genético es alcanzar la introgresión del o los caracteres deseados en una nueva variedad o cultivar [3], lo cual consiste en mover los genes de una especie a otra (o de una variedad a otra) por un proceso de hibridación y retrocruzas posteriores.

Existen tres factores básicos a considerar en un programa de mejoramiento genético, los cuales son: i) La base genética, ya que entre mayor sea el número de especies o cultivares, con características deseadas, mayor será la probabilidad de éxito al crear una nueva variedad. ii) La técnica o combinación de técnicas que se aplicarán para tener éxito (Figura 1). En este factor no existe una regla o una serie de técnicas o pasos que se deban aplicar para todas las especies, sino que se necesitarán aplicar dependiendo del éxito en cada uno de los pasos para lograr la introgresión. iii) La relación taxonómica de la especie silvestre seleccionada con el cultivo donde se debe expresar

Introduction

Genetic improvement consists of basically generating new varieties that are more productive and resistant to biotic factors, such as fungi and bacteria that cause them diseases and abiotic factors as high or freezing temperatures. In genetic improvement of ornamental plants, it is not only sufficient to generate more productive or resistant varieties but also develop new and different ones to those that already exist. The ornamental plant industry is characterized for its great diversity. Currently, more ornamental cultivated species exist than all agricultural and horticultural species combined. A continuous development of technologies exists to introduce improved versions of flowers already known, as well as new unknown ornamental species [1]. For this reason, more and more native plants with suitable ornamental characteristics are sought and selected [2]. To compete globally, superior products, new varieties or unique species are required.

Plant breeding

It is essential to know if the intention to start a breeding program is from zero, that is, with a wild species or improving an existing cultivar. The final objective of a breeding program is to reach introgression of the desired characteristics in a new variety or cultivar [3], which consists of moving the genes from one species to the other one (or from a variety to another one) through a hybridization process and subsequent backcrosses.

Three basic factors should be considered in a genetic improvement program: (i) The genetic base, since the greater the number of species or cultivars with desired characteristics, the greater the probability of success in creating a new variety; (ii) The technique or combination of techniques that will be applied to be successful (Figure 1.) In this factor there is no rule or series of techniques or steps that must be applied for all species, but that will need to be applied depending on the success in each of the steps to achieve introgression; (iii) The taxonomic relationship of the selected wild species to the crop where the trait is to

el rasgo. La taxonomía tradicional agrupa diferentes especies en géneros, secciones y subsecciones basadas en caracteres morfológicos. Bajo este criterio, cuando la hibridación interespecífica es posible dentro de un grupo taxonómico específico, se podría esperar que las cruzas que involucren especies relacionadas sean posibles. Sin embargo, esto no siempre es cierto para ciertas especies agrupadas (por taxonomía tradicional) en una sección o subsección determinada dentro de un género [4]. Los caracteres morfológicos no siempre son suficientes para determinar si las especies están estrechamente relacionadas o no. Hoy en día las técnicas moleculares permiten mejorar el establecimiento de relaciones taxonómicas entre diferentes especies. La consideración de la taxonomía tradicional, reforzada con evidencia molecular, podría dar una visión más clara de la relación taxonómica entre especies y contribuir a mejorar un programa de mejoramiento [4].

be expressed. Traditional taxonomy groups different species into genera, sections, and subsections based on morphological characters. Under this criterion, when interspecific hybridization is possible within a specific taxonomic group, crosses involving related species might be expected to be possible. However, this is not always true for certain species grouped (by traditional taxonomy) in a given section or subsection within a genus [4]. Morphological characters are not always sufficient to determine whether species are closely related or not. Nowadays, molecular techniques allow to improve the establishment of taxonomic relationships between different species. Consideration of traditional taxonomy, reinforced with molecular evidence, could give a clearer view of the taxonomic relationship between species and contribute to improve a breeding program [4].

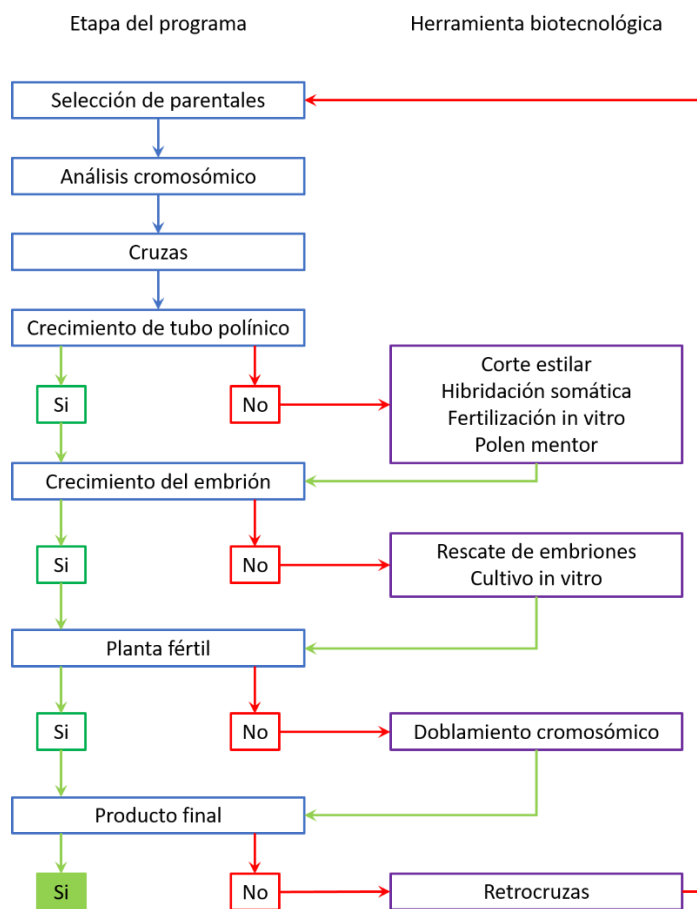


Figura 1. Representación esquemática simplificada de las diferentes etapas de un programa de mejoramiento genético vegetal y las herramientas biotecnológicas que pueden utilizarse para solventar los problemas que pudieran presentarse hasta lograr el producto final

Figure 1. Simplified schematic representation of the different stages of a plant breeding program and the biotechnological tools that can be used to solve the problems that may arise until the final product is obtained.

Hibridación

Un programa de mejoramiento genético es exitoso cuando en una cruce se logra la fecundación, el crecimiento y germinación del embrión y existe la capacidad de realizar cruces con la nueva planta. La reproducción sexual de las plantas depende de la interacción altamente específica entre el polen y el pistilo, el gametofito masculino y el órgano reproductor femenino, respectivamente [5]. Este proceso comienza cuando el grano de polen entra en contacto con el estigma y se hidrata. Después germina y emerge el tubo polínico que penetra intercelularmente a través de la matriz extracelular del tejido transmisor hasta que alcanza al ovario donde libera espermatozoides dentro del óvulo, para culminar con la germinación. Este proceso es muy complejo e implica muchas interacciones, incluido el reconocimiento de célula a célula, las señales intracelulares e intercelulares, así como otros factores [5].

De manera natural, existen diferentes mecanismos que previenen la hibridación interespecífica, los cuales se dividen en barreras pre- y post-fertilización [6]. Las barreras pre-fertilización, además del aislamiento geográfico son conocidas incongruencias e incompatibilidades que impiden la fertilización. La incompatibilidad se puede describir como un crecimiento deficiente del tubo polínico. Los granos de polen de especies incompatibles no son capaces de metabolizar ciertas sustancias presentes en el estigma, reduciendo sus propias reservas y provocando un crecimiento deficiente [7]. Las especies incompatibles se han dividido en dos grupos dependiendo de si las sustancias del grano de polen, responsables de la incompatibilidad, se forman antes o después de que se haya producido la meiosis. Si estas sustancias se forman en la célula madre del polen, se dice que la especie muestra una incompatibilidad determinada esporofíticamente. Si esas sustancias no se forman hasta después de la meiosis y, por tanto, se ha producido la segregación, se considera que presentan incompatibilidad determinada gametofíticamente. Existen variaciones en cada uno de estos sistemas, en particular con respecto al número de loci S y las relaciones de interacción entre los alelos [8]. La incongruencia se puede describir como resultado de la falta de información genética en uno de los padres para completar los procesos pre- y post-polinización en el otro [9].

Las barreras post-fertilización principalmente afectan el desarrollo del embrión [6]. Se han desarrollado muchas técnicas diferentes para superar las barreras previas a la fertilización, entre las que se incluyen: i) Corte estilar. El cual consiste en cortar el estilo de la flor y colocar el polen del progenitor paterno. [10]. ii) Extracción de estilo, donde se extrae el estilo, se frota con polen de otra especie y se reintroduce en el ovario [11]. iii) Polinización intraestilar. En esta técnica se utiliza un estilo de especie compatible como donante del pistilo y el estigma se poliniza con polen de otra especie [12,13]. iv) Polinización in vitro, que se puede dividir

Hybridization

A breeding program is successful when fertilization, embryo growth and germination are achieved in a cross and there is the ability to cross with the new plant. Sexual plant reproduction depends on highly specific interaction between pollen and pistil, the male gametophyte and the female reproductive organ, respectively [5]. This process begins when the pollen grain comes into contact with the stigma and hydrates. It then germinates and the pollen tube emerges and penetrates intercellularly through the extracellular matrix of the transmitter tissue until it reaches the ovary where it releases sperm into the ovule culminating in germination. This process is very complex and implies many interactions, including cell-to-cell recognition, intracellular and intercellular signaling, as well as other factors [5].

Naturally, there are different mechanisms that prevent interspecific hybridization, which are divided into pre- and post-fertilization barriers [6]. Pre-fertilization barriers, in addition to geographic isolation, are known incongruities and incompatibilities that prevent fertilization. Incompatibility can be described as poor pollen tube growth. Pollen grains of incompatible species are not able to metabolize certain substances present in the stigma, reducing their own reserves and causing poor growth [7]. Incompatible species have been divided into two groups depending on whether the substances in the pollen grain responsible for the incompatibility are formed before or after meiosis has occurred. If these substances are formed in the pollen mother cell, the species is said to show a sporophytically determined incompatibility. If these substances are not formed until after meiosis and segregation has therefore occurred, they are said to exhibit gametophytically determined incompatibility. There are variations in each of these systems, particularly with respect to the number of S loci and the interaction relationships between the alleles [8]. Incongruity can be described as a result of the lack of genetic information in one parent to complete the pre- and post-pollination processes in the other [9].

Post-fertilization barriers mainly affect embryo development [6]. Many different techniques have been developed to overcome pre-fertilization barriers, including: (i) Cut Style – this technique consists of cutting the style of the flower and placing the pollen from the paternal parent [10]; (ii) Stylar extraction – where the style is removed, rubbed with pollen from another species and reintroduced in the ovary [11]; (iii) Intrastylar pollination – this technique uses a style from a compatible species as pistil donor and the stigma is pollinated with the pollen of another species [12,13]; (iv) In vitro pollination, which can be divided

en: a) Polinización estigmática. Consiste en la polinización normal y el cultivo artificial sucesivo de todo el pistilo [14] y b) Polinización placentaria. Se hace un corte longitudinal en el ovario, exponiendo los óvulos, y luego se aplica polen [15]. Una vez que se logra la polinización, el embrión híbrido debe crecer. Debe haber un equilibrio para el intercambio de nutrientes entre el embrión y el endospermo. Si no se logra este equilibrio, el embrión es abortado en las primeras etapas de desarrollo o el endospermo se desintegra. Dependiendo de la etapa del aborto embrionario, se pueden aplicar diferentes técnicas in vitro para rescatar al embrión abortado [16]. Estas técnicas se han utilizado para generar varios híbridos interespecíficos: i) Corte de ovario. El ovario se secciona en rodajas, y estas se colocan in vitro, donde las semillas pueden crecer hasta que los embriones puedan ser disecados y cultivados [10,17,18]. ii) Cultivo de ovarios. Los ovarios se esterilizan en la superficie y los óvulos se cultivan in vitro hasta que los embriones se pueden extirpar o germinar [19]. iii) Rescate de embriones. Los embriones inmaduros se extraen de los óvulos y se colocan en un medio nutritivo hasta que germinan [10,19]. Este podría ser el método más eficaz para producir híbridos.

Una alternativa a la hibridación sexual es la hibridación somática ó fusión de protoplastos [20]. Puede considerarse como una técnica simple para la producción de híbridos interespecíficos, intergenéricos e incluso interfamiliares. Sin embargo, dado que implica la fusión de dos especies relacionadas lejanamente, no siempre resulta en la formación de plántulas. La hibridación somática es posible mediante el uso de fusión eléctrica o fusiones químicas, inducidas por: i) nitrato de sodio, ii) polietilenglicol (PEG), iii) pH alto, Ca + 2 alto o una combinación de ii y iii. [21,22]. Con estas técnicas, primero se ponen en contacto los protoplastos, después de lo cual se puede inducir a sus membranas plasmáticas a fusionarse para finalmente formar una sola célula [23]. Una de las principales ventajas de la hibridación somática es la producción de "cíbridos" que, a diferencia de los híbridos convencionales, los genes citoplasmáticos son de ambos padres.

Esterilidad de los híbridos

Una vez que se ha logrado obtener los híbridos interespecíficos puede surgir un nuevo problema, este es la esterilidad en los híbridos F¹. La principal causa de esta esterilidad es debida a un bajo apareamiento de cromosomas durante la meiosis [24,25,26], además de muchas otras anomalías, las cuales pueden ser letales, lo que dificulta la reproducción posterior de los híbridos, imposibilitando continuar con los trabajos de mejoramiento [27].

into: (a) Stigmatic pollination – it consists of normal pollination and successive artificial culture of the entire pistil [14] and (b) Placental pollination – a longitudinal cut is made in the ovary; ovules are exposed and then pollen is applied to the ovary [15].

Once pollination is achieved, the hybrid embryo must grow. There must be a balance for nutrient exchange between the embryo and the endosperm. If this balance is not achieved, the embryo is aborted in the early stages of development or the endosperm disintegrates. Depending on the stage of embryo abortion, different in vitro techniques can be applied to rescue the aborted embryo [16]. These techniques have been used to generate several interspecific hybrids: (i) Ovary slice – the ovary is sectioned in slices and these placed in vitro where the seeds can grow until the embryos can be dissected and cultured [10,17,18]; (ii) Ovule culture – ovaries are surface sterilized and the ovules are cultured in vitro until the embryos can be excised or germinated [19]; (iii) Embryo rescue – immature embryos are removed from the ovules and placed in a nutrient medium until they germinate [10,19]. This could be the most efficient method to produce hybrids.

An alternative to sexual hybridization is somatic hybridization or protoplast fusion [20]. It can be considered as a simple technique for the production of interspecific, intergeneric, and even interfamilial hybrids. However, since it implies the fusion of two distantly related species, it does not always result in the formation of seedlings. Somatic hybridization is possible by using electrical fusion or chemical fusions, induced by: (i) sodium nitrate; (ii) polyethylene glycol (PEG); (iii) high pH, high Ca + 2, or a combination of ii and iii. [21,22]. With these techniques, protoplasts are first brought into contact, after which their plasma membranes can be induced to fuse to finally form a single cell [23]. One of the main advantages of somatic hybridization is the production of "cybrids" which, unlike conventional hybrids, the cytoplasmic genes are from both parents.

Hybrid sterility

Once interspecific hybrids have been obtained, a new problem may arise, namely sterility in F¹ hybrids. The main cause of sterility is due to low chromosome pairing during meiosis [24,25,26] in addition to many other anomalies, which can be lethal, making it difficult to reproduce the hybrids later, making it impossible to continue with the breeding work [27].

Restauración de la fertilidad

La poliploidización mitótica, o doblamiento cromosómico es la técnica más utilizada para restaurar la fertilidad. En esta técnica se utilizan "venenos del huso acromático", ya que actúan inhibiendo la formación del huso durante la división celular [28]. Existen muchos venenos del huso, entre los que destacan: i) la colchicina, que se extrae de las semillas o granos de *Colchicum autumnale* L. (azafrán de pradera o azafrán de otoño). Actúa con la misma naturaleza que otros inhibidores del huso mitótico, una vez que entra en contacto con las células en división, inhibe la polimerización de los microtúbulos al unirse a la tubulina, lo que provoca una distribución desigual de los cromosomas que degenera en un cambio de la ploidía de las células hijas. Suele aplicarse en un rango de concentración de 1.25 a 2.5 mM [29]. ii) La orizalina, un herbicida de dinitroanilina, también se utiliza como agente anti-microtúbulos. La ventaja del uso de la orizalina, al uso de la colchicina, es que con la orizalina se utilizan concentraciones muy bajas ($1.0 \cdot 10^{-8}$ M) para reducir la tasa de migración de los cromosomas anafase. Mientras que concentraciones más altas ($1.0 \cdot 10^{-7}$ M) detienen completamente la migración cromosómica. A esta concentración, los microtúbulos se despolimerizan y previenen la polimerización de nuevos microtúbulos en todas las etapas del ciclo mitótico, sin afectar la condensación cromosómica [30]. La utilización de este veneno del huso para inducir tetraploides ha aumentado con los años, reemplazando el uso de colchicina. Y iii) El óxido nitroso, este es conocido como anestésico por inhalación, sin embargo, también se utiliza como agente poliploidizante como la colchicina y la orizalina. La diferencia más importante entre estos inhibidores del huso es que el óxido nitroso es un gas. Los primeros reportes de su acción como inhibidor del huso bajo presión se remontan a 1950 [31]. Los primeros poliploides y aneuploides con el uso de óxido nitroso se obtuvieron en *Crepis capillaris* [32] y se ha aplicado con éxito para producir poliploides en otras especies vegetales.

A pesar de que se restablece la fertilidad, estos métodos pueden definirse como un "callejón sin salida" para futuros programas de reproducción, porque no hay recombinación entre los genomas parentales debido al emparejamiento autosindético de los cromosomas, es decir, al duplicar los cromosomas en una célula, existen ahora dos juegos cromosómicos provenientes de la madre del híbrido y dos juegos cromosómicos del padre del híbrido, y durante la meiosis, los cromosomas maternos se aparean con los maternos y así los paternos. Por esta razón, los híbridos de cromosomas duplicados se denominan "híbridos permanentes" y ofrecen pocas posibilidades de crear variación genética [33]. Dejando a un lado la carencia de variabilidad genética, los poliploides en general tienen otras

Restoring fertility

Mitotic polyploidization, or chromosome doubling, is the most commonly used technique to restore fertility. In this technique, "achromatic spindle poisons" are used, as they act by inhibiting spindle formation during cell division [28]. There are many spindle poisons, including: i) colchicine, which is extracted from the seeds or grains of *Colchicum autumnale* L. (meadow saffron or autumn saffron). It acts in the same nature as other mitotic spindle inhibitors, once it comes into contact with dividing cells, it inhibits the polymerization of microtubules by binding to tubulin, resulting in an uneven distribution of chromosomes that degenerates into a change in the ploidy of daughter cells. It is usually applied in a concentration range of 1.25 to 2.5 mM [29]. ii) Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, is also used as an anti-microtubule agent. The advantage of using oryzalin, to the use of colchicine, is that with oryzalin, very low concentrations ($1.0 \cdot 10^{-8}$ M) are used to reduce the rate of anaphase chromosome migration. Whereas higher concentrations ($1.0 \cdot 10^{-7}$ M) completely stop chromosome migration. At this concentration, microtubules depolymerize and prevent the polymerization of new microtubules at all stages of the mitotic cycle, without affecting chromosome condensation [30]. The use of this spindle poison to induce tetraploids has increased over the years, replacing the use of colchicine. And iii) Nitrous oxide, this is known as an inhalation anesthetic, however, it is also used as a polyploidizing agent like colchicine and oryzalin. The most important difference between these spindle inhibitors is that nitrous oxide is a gas. The first reports of its action as a spindle inhibitor under pressure date back to 1950 [31]. The first polyploids and aneuploids with the use of nitrous oxide were obtained in *Crepis capillaris* [32] and has been successfully applied to produce polyploids in other plant species.

Although fertility is restored, these methods can be defined as a "dead end" for future breeding programs because there is no recombination between the parental genomes due to autosynthetic pairing of chromosomes, i.e., by duplicating chromosomes in a cell, there are now two sets of chromosomes from the maternal parent of the hybrid and two sets of chromosomes from the paternal parent of the hybrid, and during meiosis, the maternal chromosomes pair with the maternal and thus the paternal chromosomes. For this reason, hybrids with duplicated chromosomes are called "permanent hybrids" and offer little chance of creating genetic variation [33]. Leaving aside the lack of genetic variability, polyploids in general have other advantages over their diploid counterpart, since:

- a) The increase in the number of alleles of a given

ventajas sobre su contraparte diploide, ya que: a) El aumento en el número de alelos de un gen dado en un poliploide debería permitir el enmascaramiento de mutaciones recesivas dañinas [34]. b) Respecto a alopoliploides y autopoliploides heterocigotos; La heterosis permite que la descendencia muestre un comportamiento transgresor en comparación con la especie parental [35]. A diferencia de los híbridos diploides en los que el vigor híbrido disminuye en generaciones posteriores debido a la recombinación homóloga, la heterosis es estable en los alopoliploides debido al apareamiento disómico predominante de cromosomas homólogos idénticos [36,37]. c) Existe la posibilidad de que las copias genéticas duplicadas puedan evolucionar para asumir funciones nuevas o ligeramente variadas, permitiendo potencialmente la expansión de nichos ecológicos o una mayor flexibilidad en la capacidad del organismo para responder a los cambios ambientales [38,39]. d) De manera general, los poliploides presentan mayor tamaño de sus hojas, tallos y flores que su contraparte diploide.

Una alternativa a la poliploidización mitótica es la utilización de gametos " $2n$ " ó "no reducidos" (poliploidización meiótica). Este tipo de gametos se originan debido a una variación de la meiosis en las plantas. El proceso que conduce a la formación de gametos $2n$ se llama restitución nuclear meiótica que ocurre durante la micro o megasporogénesis [33]. Los gametos no reducidos contribuyen con dos conjuntos de cromosomas a la progenie (de plantas diploides), la mayoría de las veces genera progenies triploides y tetraploides, dependiendo de si los gametos " n " o " $2n$ " son aportados por uno o ambos padres, o si la cruce se realiza utilizando un progenitor tetraploide y uno que genere los gametos no reducidos. Los gametos " n " se encuentran en la mayoría de las especies y muchos autores les atribuyen el origen de especies de plantas poliploides [33,40,41].

Este tipo de poliploidización ofrece grandes posibilidades de reproducción, porque la heterocigosidad no es fija, porque la recombinación entre los genomas parentales está presente en los poliploides sexuales [42,43]. El atributo principal de los gametos no reducidos es que se logra la introgresión de segmentos cromosómicos de la especie parental e incluso si se realizan retrocruzas, los segmentos cromosómicos introgresados permanecen en la progenie.

Hasta ahora se conoce que la formación de gametos no reducidos puede suceder en muchas especies y que existen controles genéticos que activan su producción [33], los cuales están en la mayoría de las veces, ligados a cambios ambientales drásticos. Durante la formación de estos gametos, los cromosomas migran hacia los polos en distintas etapas, segregando las cromátidas de diferente manera, por lo que estos gametos pueden agruparse por la manera en que segregan las cromátidas durante la meiosis y por sus consecuencias genéticas. i) "Restitución de la

gene in a polyploid should allow masking of deleterious recessive mutations [34]. b) With respect to heterozygous allopolyploids and autopolyploids; heterosis allows the offspring to show transgressive behavior compared to the parental species [35]. Unlike diploid hybrids in which hybrid vigor decreases in later generations due to homologous recombination, heterosis is stable in allopolyploids due to the predominant disomic pairing of homologous identical chromosomes [36,37]. c) There is the possibility that duplicate gene copies may evolve to take on new or slightly varied functions, potentially allowing for the expansion of ecological niches or greater flexibility in the organism's ability to respond to environmental changes [38,39]. d) In general, polyploids have larger leaf, stem and flower size than their diploid counterpart.

An alternative to mitotic polyploidization is the use of " $2n$ " or "unreduced" gametes (meiotic polyploidization). This type of gametes originate due to a variation of meiosis in plants. The process leading to the formation of $2n$ gametes is called meiotic nuclear restitution that occurs during micro- or megasporogenesis [33]. The unreduced gametes contribute two sets of chromosomes to the progeny (of diploid plants), most often generating triploid and tetraploid progeny, depending on whether the " n " or " $2n$ " gametes are contributed by one or both parents, or whether the cross is made using a tetraploid parent and one that generates the unreduced gametes. The " n " gametes are found in most species and many authors attribute to them the origin of polyploid plant species. [33,40,41].

This type of polyploidization offers great reproductive possibilities, because heterozygosity is not fixed, because recombination between the parental genomes is present in sexual polyploids [42,43]. The main attribute of unreduced gametes is that introgression of chromosomal segments from the parental species is achieved and even if backcrosses are performed, the introgressed chromosomal segments remain in the progeny.

So far it is known that the formation of unreduced gametes can occur in many species and that there are genetic controls that trigger their production [33], which are most often linked to drastic environmental changes. During the formation of these gametes, chromosomes migrate toward the poles at different stages, segregating chromatids in different ways, so these gametes can be grouped by the way they segregate chromatids during meiosis and by their genetic consequences. (i) "First division restitution" (FDR) – the entire chromosomal complement divides equally before telophase I followed by cytokinesis,

primera división” o FDR por sus siglas en inglés (First Division Restitution), en este tipo, todo el complemento cromosómico se divide de manera equitativa antes de la telofase I seguida de la citocinesis, lo que lleva a la formación de una díada. ii) “Restitución de la segunda división” ó SDR (Second Division Restitution), los cromosomas se dividen de manera reductiva en la anafase I y en la telofase I ocurre la citocinesis, las cromátidas se dividen, pero el núcleo se restituye produciendo una díada. Y iii) Restitución meiótica indeterminada o IMR (Indeterminate Meiotic Restitution), este mecanismo combina características de ambos tipos mencionados anteriormente, durante la primera división meiótica algunos de los univalentes se dividen ecuacionalmente (como en FDR) y algunos bivalentes se separan reduccionalmente (como en SDR) antes de la telofase I cuyo resultado final, al igual que en los mecanismos anteriores, es a una díada [28,44].

Inducción de gametos no reducidos

Como se describió anteriormente son obvias las ventajas del uso de gametos no reducidos sobre los gametos de plantas a las que se les han doblado los cromosomas por métodos químicos, denominados “autopoliploides somáticos”. El gran problema que existe es que la producción de gametos no reducidos es que no son fácil de detectar, se producen en baja frecuencia y dependen de condiciones climáticas aún desconocidas. Algunos de los intentos por inducir este tipo de gametos incluyen: la selección genética [45], alta irradiación solar [46], bajas temperaturas [47], tratamientos con calor [48]. Sin embargo, ninguno de los intentos anteriores ha sido realmente exitoso. Recientemente se ha utilizado el óxido nitroso (N_2O) para inducir este tipo de gametos, ya que el N_2O es un gas y es posible tratar órganos enteros bajo presión. Estos tratamientos han sido realizados en el género *Lilium*, en donde botones florales, en donde la meiosis aún no ha ocurrido fueron tratados con el gas bajo diferentes presiones y por diferentes tiempos. El resultado fue el incremento de la producción de gametos no reducidos en genotipos que se conocía que los producían, sumado a la producción de este tipo de gametos en genotipos completamente estériles. Fue posible generar progenie utilizando tanto el polen como los óvulos de las plantas tratadas y lo más importante fue la detección de recombinación cromosómica en la progenie, logrando así una verdadera introgresión [49,50].

Conclusión

Como se ha descrito, no existe una sola técnica para alcanzar el éxito en un programa de mejoramiento genético, las técnicas a utilizar dependen del éxito alcanzado en cada uno de los pasos y en la medida en que se vayan solucionando las diferentes barreras o problemas que se

leading to the formation of a dyad; (ii) “Second division restitution” (SDR) – the chromosomes divide reductively in anaphase I and in telophase I cytokinesis occurs, the chromatids divide, but the nucleus is restored producing a dyad. And (iii) Indeterminate meiotic restitution (IMR) – his mechanism combines features of both types mentioned above, during the first meiotic division some of the univalents divide equationally (as in FDR) and some bivalents separate reductively (as in SDR) before telophase I which final result, as in the previous mechanisms, is a dyad. [28,44].

Induction of unreduced gametes

As described above, the advantages of using non-reduced gametes over gametes from plants that have had their chromosomes doubled by chemical methods, called “somatic autopolyploids”, are obvious. The major problem is that the production of unreduced gametes is not easy to detect, occurs at low frequency and depends on as yet unknown climatic conditions. Some of the attempts to induce such gametes include: genetic selection [45], high solar irradiation [46], low temperatures [47], heat treatments [48]. However, none of the above attempts have been really successful.

Recently, nitrous oxide (N_2O) has been used to induce such gametes, since N_2O is a gas and it is possible to treat whole organs under pressure. These treatments have been carried out in the genus *Lilium*, where flower buds, where meiosis has not yet occurred, were treated with the gas under different pressures and for different times. The result was an increase in the production of unreduced gametes in genotypes known to produce them, in addition to the production of such gametes in completely sterile genotypes. It was possible to generate progeny using both pollen and ovules from treated plants, and the most important thing was the detection of chromosomal recombination in the progeny, thus achieving true introgression. [49,50].

Conclusion

As described above, there is no single technique to achieve success in a genetic improvement program. The techniques to be used depend on the success achieved in each of the steps and on the extent to which the different barriers or problems that may arise are solved, this will be the guide to select the different techniques to meet the objectives of the breeding program.

puedan ir presentando, esto será la guía para seleccionar las diferentes técnicas para cumplir con los objetivos del programa de mejoramiento genético.

Referencias References

1. Weiss D (2002) Introduction of new cut flower: domestication of new species and introduction of new traits not found in commercial varieties. In: Vainstein A (ed). *Breeding for ornamentals: Classical and Molecular approaches*. Kluwer academic, Netherlands, pp 129-137
2. Chimonidou D, Vlahos JC, Odysseos E, *et al.* (2005) Evaluation of species from Cyprus Flora for sustainable use in commercial floriculture. *Acta Hort* 683: 111-119
3. Lim K-B, Van Tuyl JM (2006). Lily, *Lilium* hybrids. In: Anderson NO (ed), *Flower breeding & genetics: Issues, challenges and opportunities for the 21st century*, Springer Verlag, pp 517-537
4. Barba-Gonzalez R, Tapia-Campos E, Rodriguez-Domínguez JM (2020). Wild species, invaluable resources for breeding new ornamental crops. *Acta Hort* 1283, 105-120
5. Knox RB (1984). Pollen-pistil interactions. In: Linskens HF, Heslop-Harrison J (eds) *Cellular interactions*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 508-608
6. Stebbins GL (1958) The inviability, weakness, and sterility of interspecific hybrids. *Adv Genet* 9:147-215
7. Ascher PD (1966) A gene action model to explain gametophytic self- incompatibility. *Euphytica* 15: 179-183
8. Bali PN, Hecht A (1965) The genetics of self-incompatibility in *Oenothera rhombipetala*. *Genetica* 36: 159-171
9. Hogenboom NG (1973) A model for incongruity in intimate partner relationships. *Euphytica* 22: 219-233
10. Van Tuyl JM, Van Diën MGM, Van Creij TCM, *et al.* (1991) Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. *Plant Sci* 74: 115-126
11. Dubouzet JG, Arisumi K-I, Etoh T (1994) Studies on the development of new ornamental *Allium* through interspecific hybridization III. Hybridization of autumn-flowering species through pull-style pollination, cutflower culture and embryo rescue. *Mem Fac Agr Kagoshima Univ* 30: 35-42
12. Asano Y, Myodo H (1977) Studies on crosses between distantly related species of Lilies. I. For the intrastylar pollination technique. *J Jpn Soc Hortic Sci* 46: 59-65.
13. Asano Y (1980) Studies on crosses between distantly related species of Lilies. VI. Pollen-tube growth in interspecific crosses on *Lilium longiflorum* (L). *J Japan Soc Hort Sci.* 49: 392-396
14. Balatková V, Tupý J (1973). The significance of the methods of stigmatal and placental pollination in vitro in *Antirrhinum majus* L.; seed and callus formation on placentae. *Biologia Plantarum.* 15: 102-106
15. Zenkteler M, Wojciechowicz M, Bagniewska-Zadworna A, *et al.* (2003). Preliminary results on studies of in vivo and in vitro sexual reproduction of *Salix viminalis* L. *Dendrobiology* 50: 37-42
16. Van Tuyl JM, De Jeu MJ (1997) Methods for overcoming interspecific crossing barriers. In: Shivanna KR, Sawhney VK (eds), *Pollen biotechnology for crop production and improvement*. Cambridge University Press
17. Van Creij MGM, Kerckhoffs DMFJ, Van Tuyl JM (2000) Application of four pollination techniques and of hormone treatment for bypassing interspecific crossing barriers in *Lilium* L. *Acta Hort* 508: 267-274
18. Arzate-Fernandez AM, Nakazaki T, Tanisaka T (2006) Production of diploid and triploid interspecific hybrids between *Lilium concolor* and *L. longiflorum* by in vitro ovary slice culture. *Plant Breeding.* 117: 479-484

19. Bino RJ, Janssen MG, Franken J, *et al.* (1989) Enhanced seed development in the interspecific cross *Allium cepa* × *A. sphaerocephalon* through ovary culture. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 16: 135-142
20. Carlson PS, Smith HH, Dearing RD (1972). Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 2292-2294
21. Evans DA (1983) Protoplast fusion. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV *et al* (eds) *Handbook of plant cell culture*. Volume I. Macmillan Publications Co. New York
22. Pelletier G, Primard C, Vedel F, *et al.* (1983). Intergeneric cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion. *Mol Gen Genet* 191: 244-250
23. Gürel S, Gürel E, Kaya Z (2002) Protoplast fusion in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) *Turk J Biol* 26: 163-170
24. Ohri D, Khoshoo TN (1983) Cytogenetics of garden *Gladiolus*. Origin and evolution of ornamental taxa. IV. *Proc Indian National Sci Acad* 3: 279-294
25. Ishizaka H (1994) Chromosome association and fertility in the hybrid of *Cyclamen persicum* Mill. *C. hederifolium* Aiton and its amphidiploid. *Breeding Sci* 44: 367-371
26. Yabuya T (1991) Chromosome associations and crossability with *Iris ensata* Thunb. In induced amphidiploids of *I. laevigata* Fisch. × *I. ensata*. *Euphytica* 55: 85-90
27. Asano Y (1982) Chromosome association and pollen fertility in some interspecific hybrids of *Lilium*. *Euphytica* 31: 121-128
28. Barba-Gonzalez R, Lim K-B, Zhou S, *et al.* (2008). Interspecific hybridization in lily: The use of 2n gametes in Interspecific lily hybrids. In: Teixeira da Silva J.A. (ed) *Floriculture, Ornamental and plant biotechnology. Advances and topical issues Volume V*. Global Science Books, UK
29. Pintos B, Martín Calvarro L, Gómez Garay A (2014) Agentes antimitóticos en la obtención de plantas doble-haplóides. *Reduca (Biol.)* 7, 12-18
30. Morejohn LC, Bureau TE, Molè-Bajer *et al.* (1987) Oryzalin, a dinitro-aniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta* 172: 252–264
31. Ferguson J, Hawkins SW, Doxey, D (1950) C-mitotic action of some simple gases. *Nature* 165: 1021-1022
32. Östergren G (1954) Polyploids and aneuploids of *Crepis capillaris* produced by treatment with nitrous oxide. *Genetica* 27: 54-64
33. Ramanna MS, Jacobsen E (2003) Relevance of sexual polyploidization for crop improvement – A review. *Euphytica* 133: 3-18
34. Gu Z, Steinmetz LM, Gu X, *et al.* (2003). Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* 421, 63–66
35. Birchler JA, Yao H, Chudalayandi S, *et al.* (2010) Heterosis. *Plant Cell* 22: 2105-2112
36. Ohno S (1970) *Evolution by Gene Duplication*, Springer, New York: Springer
37. Comai L (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat Rev Genet* 6: 836-846
38. Adams KL, Wendel JF (2005). Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr Opin Biol* 8: 135-141
39. Moore RC, Purugganan MD (2005) The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. *Curr Opin Biol* 8: 122-128
40. Harlan JR, De Wet JMJ (1975) On Ö. Winge and a prayer: The Origins of Polyploidy. *Bot Rev* 41: 361-390
41. Veilleux R (1985) Diploid and polyploid gametes in crop plants: mechanisms of formation and utilization in plant breeding. *Plant Breeding Rev* 3: 252-288

42. Bretagnolle F, Thompson JD (1995) Tansley Review No. 78 Gametes with somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist* 129: 1-22
43. Soltis PS, Soltis DE (2000) The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proc Natl Acad Sci USA - Biology* 97: 7051-7057
44. Lim K-B, Ramanna MS, de Jong JH, *et al.* (2001). Indeterminate meiotic restitution (IMR): a novel type of meiotic nuclear restitution mechanism detected in interspecific lily hybrids by GISH. *Theor Appl Genet* 103: 219-230
45. Jacobsen E (1976) Cytological studies on diplandroid production in dihaploid potato clone and its correlation with seed set in 4x-2x crosses. *Zeitschrift Pflanzzüchtg* 77: 10-15
46. Negri V, Lemmi G (1998) Effect of selection and temperature stress on the production of 2n gametes in *Lotus tenuis*. *Plant Breeding* 117: 345-349
47. Lutkov AN (1937) On the artificial induction of polyploid gametes by treatment by with low temperatures and chloroform. *Trudy po Prikladnoi Botanike Genetike i Seleksii* 7, 127-150
48. Lokker AC, Barba-Gonzalez R, Lim K-B, *et al.* (2004) Genotypic and environmental variation in production of 2n gametes of Oriental × Asiatic lily hybrids. *Acta Hort* 673: 453-456
49. Barba-Gonzalez R, Miller CT, Ramanna MS, *et al.* (2006) Nitrous oxide (N₂O) induces 2n gametes in sterile F₁ hybrids between Oriental × Asiatic lily (*Lilium*) hybrids and leads to intergenomic recombination. *Euphytica* 148, 303-309
50. Barba-Gonzalez R, Miller CT, Ramanna MS, *et al.* (2006). Induction of 2n gametes for overcoming F₁-sterility in lily and tulip. *Acta Hort* 714: 99-106

Capítulo IX

Control Biológico de Plagas con Microorganismos Entomopatógenos

Biological Control of Insect Pest by Entomopathogenic Microorganisms

Jhony Navat Enriquez Vara^{1*}

¹CONACYT- Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México, CP 45019. *Autor de correspondencia: jenriquez@ciatej.mx

Introducción

La producción de alimentos en el siglo pasado y en el presente ha sido intensiva debido principalmente al aumento de la población. Para mantener o en su caso aumentar los rendimientos de los cultivos agrícolas se ha requerido del uso de insecticidas. En la producción agrícola la pérdida directa del rendimiento de los cultivos es por fitopatógenos, insectos y malezas que representa del 20 al 40 % de la productividad, y en parte los pesticidas han ayudado a mantener los rendimientos de los principales cultivos [1]. Sin embargo, el uso excesivo de los insecticidas ha conducido a un daño considerable al medio ambiente, pérdida de la biodiversidad, resistencia de los insectos a los principales ingredientes activos de los plaguicidas, aparición de nuevas plagas, contaminación de los suministros de agua dulce, así como daños a la salud de los trabajadores y consumidores de los productos agrícolas [2, 3].

Para revertir las desventajas que tiene el uso inadecuado de los insecticidas, se han desarrollado alternativas amigables con el medio ambiente mediante el uso de enemigos naturales para el control biológico de plagas. Dentro de este grupo se encuentran algunas especies de bacterias, hongos, nematodos y virus entomopatógenos. Es importante resaltar que el control biológico es regular las poblaciones de las plagas, no de erradicarlas, de tal manera que la densidad de la población de insectos plaga, no afecte el rendimiento de los cultivos agrícolas.

En condiciones naturales, es común encontrar a las larvas y adultos de los insectos infectados con bacterias, hongos, virus y nematodos entomopatógenos, que representan un factor importante en la regulación ecológica de las poblaciones de los insectos [4, 5]. El uso de estos agentes de control biológico causantes de enfermedades en los insectos o productos derivados de estos (enzimas, toxinas) y su aplicación como bioinsecticidas para reducir la densidad de los insectos plaga se llama "control microbiano" [6]. El control microbiano de plagas se ha utilizado como parte del manejo integrado de plagas de cultivos agrícolas a cielo abierto, invernaderos, huertos, ornamentales, céspedes, granos almacenados, bosques, y en la reducción de plagas y vectores de insectos de importancia veterinaria y médica [7]. Dentro de las ventajas que ofrece el uso de

Introduction

Food production has been intensive since the last century and currently mainly because of population increase. To maintain or in its case increase agricultural crop yield, the use of pesticides has been required. In agriculture production the direct loss of crop yield is by phytopathogens, insects, and weeds, which represent from 20 to 40% of production, and in a way pesticides have helped to maintain yield of the main crops [1]. However, their excessive use has led to a considerable damage to the environment, biodiversity loss, insect resistance to the main active ingredients of pesticides, emergence of new pests, contamination of fresh water supply, as well as health damage to workers and consumers of agricultural products [2, 3].

To reverse the disadvantages that inadequate pesticide use has, environmental-friendly alternatives have been developed by means of using natural enemies for biological pest control. Within this group, some species of entomopathogenic bacteria, fungi, nematodes and virus are found. Thus the need to highlight that the purpose of biological control is to regulate pest populations rather than eradicate them, in such a way that insect pest population density does not affect agricultural crop yield.

In natural conditions, insect larvae and adults infected with bacteria, fungi, virus, and nematodes are commonly found, representing an important factor in ecological regulation of insect populations [4, 5]. The use of these biological control agents that cause diseases in insects or products derived from them (enzymes, toxins) and their application as biopesticides to reduce pest insects is called microbial control [6]. Microbial control of pest has been used as part of integrated pest management of field crops, greenhouse, orchards, ornamentals, grasses, grain storage, forests, and in reduction of insect pests and vectors of veterinarian and medical importance [7]. Within the advantages offered by using entomopathogenic microorganisms are that they are specific, safe for humans and other non-objective

microorganismos entomopatógenos es su especificidad, son seguros para los humanos y otros organismos no objetivo, contribuyen a la disminución de residuos de insecticidas en los alimentos, preservación de los enemigos naturales y aumento de la biodiversidad en los agroecosistemas.

El uso de microorganismos para el control biológico de insectos no es un tema nuevo. En 1835, Agostino Bassi fue uno de los primeros científicos en demostrar que el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* provocaba la enfermedad conocida como "muscardina blanca" en el gusano de seda. También, Louis Pasteur logró demostrar que el gusano de seda se enfermaba por el microsporidio *Nosema bombycis*. Desde entonces se estableció que los microorganismos son capaces de provocar enfermedades en los insectos. Por otra parte, en 1879 Elie Metchnikoff cultivó por primera vez al hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en un medio artificial después de aislarlo del insecto *Anisoplia austriaca*, y sugirió su uso como agente de control microbiano de insectos plaga. Sin embargo, *M. anisoplia* fue evaluado como agente de control biológico hasta 1888 [8]. A partir de estos años fue que se desarrollaron una multitud de microorganismos entomopatógenos como agentes de control microbiano de plagas, sin embargo, fue a mediados del siglo XX que se comercializaron y aplicaron productos bioinsecticidas para el control de insectos plaga.

Existen tres maneras de usar a los microorganismos entomopatógenos como agentes de control biológico de plagas, la primera es la estrategia de control microbiano clásico que consiste en introducir un entomopatógeno nativo de una plaga invasora para disminuir las poblaciones de los insectos a largo plazo. La segunda estrategia es por conservación, básicamente consiste en mantener el hábitat lo menos perturbado para favorecer la persistencia e incremento de los microorganismos entomopatógenos que ocurren en forma natural en un agroecosistema. La tercera estrategia es por aumento, la cual se divide en inoculativa e inundativa. La estrategia inoculativa o de autodiseminación es la aplicación de pequeñas cantidades de unidades infectivas (conidios, esporas, blastosporas, viriones, juveniles infectivos J3) de los entomopatógenos en las poblaciones de insectos con el objetivo de incrementar la densidad de los entomopatógenos por sí solos. En esta estrategia los propios insectos pueden transmitir sus propias enfermedades, comúnmente los insectos son atraídos a trampas con feromonas de agregación o sexuales y en el interior de las trampas se impregnan los entomopatógenos para que los propios insectos acarreen sus patógenos. Mientras que la inundativa es la aplicación de grandes cantidades de unidades infectivas para iniciar infecciones en los insectos y proporcionar un control casi inmediato de las plagas [6]. El control microbiano por inundación es una de las estrategias que se usa de manera generalizada en la agricultura para liberar a los entomopatógenos, sobre todo porque se hace uso de la tecnología de aplicación de los

organismos; they also contribute to decreasing pesticide residuals in food, preserving natural enemies, and increasing biodiversity in agroecosystems.

The use of microorganisms for biological insect control is not a new topic. In 1835, Agostino Bassi was one of the first scientists to show that the entomopathogen fungus (EF) *Beauveria bassiana* caused the disease known as white muscardine in silkworm. Moreover, Louis Pasteur demonstrated that silkworm got sick by the microsporid *Nosema bombycis*. Since then, microorganisms have been established to be capable of causing diseases in insects. On the other hand, in 1879 Elie Metchnikoff cultured for the first time the EF *Metarhizium anisopliae* in an artificial medium after isolating the insect *Anisoplia austriaca*, suggesting its use as insect microbial pest control agent. However, *M. anisoplia* was assessed as a biological control agent up to 1888 [8]. Starting from this year, a multitude of entomopathogen microorganisms were developed as microbial pest control agents. Nevertheless, in the mid-20th century, biopesticide products started to be commercialized and applied for insect pest control.

Entomopathogenic microorganisms can be used as biological control agents of pest in different ways. The first one is the classic microbial control strategy that consists of introducing a native entomopathogen of an invasive pest to decrease insect populations in the long term. The second one is by conservation, which basically consists of maintaining the habitat less disturbed to favor the persistence and increase of entomopathogen organisms that occur naturally in an agroecosystem. The third strategy is by augmentation, which is divided into inoculative and inundative. The inoculative or autodissemination strategy is the application of small quantities of entomopathogen infectious units (conidia, spores, blastospores, virions, infective juveniles J3) in insect populations with the objective of increasing entomopathogen density by themselves. In this strategy, the insects themselves may transmit their own diseases. Usually, insects are attracted to traps with aggregation or sex pheromone and in the trap interior, entomopathogens are impregnated, so the insects themselves carry their pathogens. Whereas the inundative strategy is the application of large quantities of infectious units to start infections in insects and provide an almost immediate pest control [6]. Inundative microbial control is one of the strategies generally used in agriculture to release entomopathogens. Above all, by using the pesticide application technique facilitates spraying homogeneous dispersion of the infectious units, increasing the probabilities of infecting the insects in agricultural crops [8].

insecticidas que facilita la dispersión homogénea de las unidades infectivas y aumenta las probabilidades de contagio de los insectos en los cultivos agrícolas [8].

Uno de los microorganismos que se usa en el control microbiano de plagas por inundación es *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria es eficaz en el control de plagas de lepidópteros, coleópteros y dípteros. Por lo que las ventas de productos formulados a base de *B. thuringiensis* ocupan el primer lugar a nivel mundial del total del mercado de los bioinsecticidas [9]. La actividad insecticida de *B. thuringiensis* está asociada con las toxinas proteicas denominadas Cry que se producen durante la esporulación de la bacteria, estas toxinas tienen que ser ingeridas por los insectos para poderse solubilizar y activarse. Debido al pH alcalino del intestino medio de las larvas es posible la activación de las toxinas. Las proteínas Cry forman poros al insertarse en las membranas de las células intestinales de las larvas de los insectos, lo que provoca una lisis de las células, dejan de comer y mueren en un par de días [10]. Las proteínas Cry1 son activas principalmente contra larvas de lepidópteros y han sido las proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* más estudiadas con respecto a su estructura, modo de acción, producción masiva y formulación de productos comerciales (Cuadro 1). Entre las especies de lepidópteros hay una efectividad diferencial de las proteínas Cry1 (Cuadro 2). Por ejemplo, las larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Spodoptera exigua* son susceptibles a varias toxinas Cry1, sin embargo, se observa una mayor mortalidad con la proteína Cry1F y Cry1C respectivamente (Cuadro 2).

One of the microorganisms used in inundative microbial control of pest is *Bacillus thuringiensis*. This bacterium is effective to several orders of insects, including Lepidoptera, Coleoptera, and Diptera. Therefore, sales of formulated products based on *B. thuringiensis* occupy the first place at world level of the total biopesticide market [9]. *B. thuringiensis* pesticide activity is associated to Cry protein toxins, which are produced during bacterial sporulation. These toxins have to be ingested by insects to be solubilized and activated. Due to alkaline pH of larval midgut, toxin activation is possible. Cry proteins form pores while inserting in the intestinal cell membranes of insect larvae, causing cell lysis; after that, they stop eating and die in a couple of days [10]. Cry1 proteins are active mainly against several species of Lepidoptera larvae and *B. thuringiensis* pesticide proteins have been the most studied with respect to structure, mode of action, massive and commercial product production (Table 1). Among Lepidoptera species, an effective difference has been observed in Cry1 proteins (Table 2). For example, *Spodoptera frugiperda* and *S. exigua* larvae are susceptible to several Cry1 toxins, but a greater mortality has been observed with Cry1F and Cry1C proteins, respectively (Table 2).

Cuadro 1. Bioinsecticidas formulados con *Bacillus thuringiensis* para lepidopteros^a
Table 1. Bioinsecticides for lepidoptera formulated with *Bacillus thuringiensis*^a.

Nombre comercial	Serovar de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Toxina Cry
Dipel, Biobit XL, Foray 48B, Bactospeine, Thuricide, Javelin, Delfin, Steward, Vaul	kurstaki	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab
FlorBac, XenTari	aizawai	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da

^aTomado de Bravo y Soberón (2021) [11]

En términos prácticos, la selección correcta de las proteínas Cry1 nos ayudara a tener una mayor certeza en la efectividad de los bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis*. Por ejemplo, si tenemos la necesidad de controlar a *Spodoptera frugiperda* en maíz, tenemos que buscar los productos disponibles en el mercado que contengan las proteínas Cry1 y que sean tóxicas para el gusano cogollero. En el Cuadro 2, se encuentra la toxicidad de las proteínas Cry en larvas del gusano cogollero y en el Cuadro 1 están los productos comerciales disponibles con sus respectivas proteínas Cry. Revisando la información anterior, el gusano

In practical terms, the correct Cry1 protein selection helps to have a greater certainty based on *B. thuringiensis* biopesticide effectiveness. For example, if the need exists of controlling *S. frugiperda* in maize, the recommendation is to look for available products in the market containing Cry1 that are toxic for the fall armyworm. Table 2 shows the toxicity of the Cry proteins in *S. frugiperda*, and Table 1 shows the available commercial products with their respective Cry proteins. Reviewing the previous information, the fall armyworm is susceptible to Cry1Ca and Cry1Da

cogollero es susceptible a las proteínas Cry1Ca y Cry1Da, y el producto comercial que contiene esas proteínas es XenTari. En el mercado nacional existen decenas de productos comerciales parecidos al XenTari, de estos productos es necesario revisar que proteínas Cry contiene y las especies de lepidópteros que controlan.

Otro aspecto para considerar en el uso de *B. thuringiensis* es la correcta aplicación de los bioinsecticidas. De manera general, se recomienda utilizar la dosis que indican las etiquetas de los productos comerciales, aplicar los productos en los estados iniciales de las larvas, cubrir totalmente el follaje de las plantas y las aspersiones de los productos deberán realizarse por las tardes para evitar o minimizar la degradación de las proteínas Cry por la luz UV del día.

proteins, and the commercial product that contains those proteins is XenTari. Tens of commercial products similar to XenTari are found in the national market, so first they should be checked to see what Cry proteins they contain and the lepidoptera species they control.

Another aspect to consider in the use of *B. thuringiensis* is the correct biopesticide application. In general, the dose recommended is the one indicated in the commercial product label. The products should be applied in the initial larval stages. Plant foliage should be covered totally with biopesticide and spraying should preferably be done in the afternoons to avoid or minimize Cry protein degradation by ultraviolet (UV) radiation in daylight.

Cuadro 2. Toxicidad de proteínas Cry para algunos lepidópteros^a

Table 2. Cry protein toxicity for some Lepidoptera^a

Insecto	Proteínas Cry	Especificidad
<i>Spodoptera exigua</i>	Cry1Ab, Cry1Ad, Cry1Be, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Fa, Cry1If, Cry1Ja, Cry2Ac, Cry9Ca	Cry1C
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Cry1Bb, Cry1Be, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Fa, Cry1If, Cry1Ja, Cry2Aa	Cry1F
<i>Helicoverpa zea</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Be, Cry1If, Cry1Ja, Cry1Jc, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry9Aa	
<i>Plutella xylostella</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Bd, Cry1Be, Cry1Bf, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa, Cry1Gb, Cry1Gc, Cry1Ia, Cry1Ib, Cry1Id, Cry1Ie, Cry1If, Cry1Ja, Cry1Jc, Cry9Aa, Cry9Ca, Cry9Ec	Cry1B
<i>Trichoplusia ni</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ae, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Bd, Cry1Be, Cry1Bf, Cry1Ca, Cry1Cb, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa, Cry1Gc, Cry1If, Cry1Jb, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry2Ae, Cry9Aa, Cry9Ca	Cry1F y Cry1G

^aTomado de Sauka y Benintende (2008) [12]

Otro de los microbios que se utiliza en el control microbiano de plagas son los hongos entomopatógenos (HE), ocupan el segundo lugar en las ventas de productos bioinsecticidas en el mundo y Latinoamérica [7, 9]. Las enfermedades causadas por los hongos (micosis) en insectos son muy comunes de observar en ecosistemas y agroecosistemas, y en algunas ocasiones es posible observar epizootias espectaculares. Los HE actúan por contacto, los conidios se adhieren a la superficie de la cutícula del insecto, germinan, invaden directamente el exoesqueleto y crecen en el interior hasta colonizar por completo al insecto. Las unidades infectivas, es decir los conidios que se desprenden de los insectos micosados, constituyen la fuente de inóculo capaz

Other microbes that are used in microbial control of pest are entomopathogenic fungi (EPF), which occupy second place in biopesticide product sales in Latin America and in the world [7,9]. The diseases caused by fungi (mycosis) in insects are commonly observed in ecosystems and agroecosystems, and in some cases spectacular epizooty can be observed. EPF act by contact, conidia adhere to the insect cuticle surface, germinate, directly invade the exoskeleton, and grow in the interior until they colonize the insect completely. The infectious units, that is, conidia that become detached from the mycosed insects constitute the inoculum source capable of infecting healthy

de infectar nuevamente a individuos sanos. La mayoría de los HE con potencial para el control de insectos se encuentran entre los Entomphtorales (Zygomycota) y Hypocreales (Ascomycota). En este último grupo se encuentran la mayoría de los hongos entomopatógenos que se utiliza en el control microbiano de plagas principalmente porque son fáciles de reproducir los conidios en fermentación sólida y líquida [13]. Los insectos chupadores como áfidos, mosca blanca, trips, escamas, larvas y adultos de escarabajos y lepidópteros comúnmente son infectados por los HE (Cuadro 3). A pesar de la capacidad que tienen algunos HE de ser generalistas como *Beuveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, existen diferencias en la susceptibilidad entre aislamientos y especies de insectos, por lo cual es recomendable utilizar productos formulados a base de especies y cepas de HE probadas sobre el insecto plaga a controlar.

individuals again. The majority of the EPF with potential for insect control are found among, Entomphtorales (Zygomycota) and Hypocreales (Ascomycota). In this last group, the majority of this fungi used in microbial control of pest are found in this last group, mainly because conidia are easy to reproduce in solid and liquid fermentation [13]. Sucking insects, such as, aphids, white fly, thrips, scales, larvae and adult beetles and lepidoptera are commonly infected by EPF (Table 3). Despite the capacity that some of them have of being generalists, as *Beuveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, differences exist in susceptibility between isolation and insect species. Thus, products based on EPF species and strains tested on the pest insect to be controlled should be used.

Cuadro 3. Principales hongos entomopatógenos usados en México
Table 3. Main entomopathogenic fungi used in México

Hongo	Insecto
<i>Beuveria bassiana</i>	Amplio rango de huéspedes
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Amplio rango de huéspedes
<i>Metarhizium acridum</i>	Langosta y chapulín
<i>Akanthomyces (=Lecanicillium) lecanii</i>	Áfidos, mosca blanca, trips
<i>Cordyceps (=Isaria) fumosorosea</i>	Mosca blanca, áfidos
<i>Hirsutella thompsonii</i>	Ácaros
<i>Cordyceps (=Isaria) javanica</i>	Áfidos, psílido de los cítricos, mosca del vinagre de alas manchadas

Uno de los aspectos cruciales en la efectividad biológica de los HE en campo es la correcta aplicación de las unidades infectivas (conidios). Tamayo-Mejía *et al.* [14] mencionan que para tener buenos resultados con los HE es necesario considerar la cantidad de follaje y la altura de los cultivos porque de esto dependerá la cantidad de agua a utilizar para la aplicación de la suspensión de los conidios de los HE, la biología del insecto a controlar y el estado de desarrollo más susceptible a los HE, las condiciones ambientales donde se encuentran los cultivos debido a que los hongos requieren entre 20 a 25 °C y una humedad relativa alta, la concentración y viabilidad de los conidios de los HE, y el equipo de aplicación. En términos prácticos, los HE se deberán aplicar cuando los insectos se encuentren en el estado de desarrollo más susceptible, a una concentración cercana de 1×10^{13} conidios/hectárea, de preferencia por la mañana o en la tarde para reducir los efectos de la UV sobre la viabilidad de los conidios, el equipo de aplicación podrá ser una bomba de mochila manual o motorizada así como equipo de aspersión montado a un tractor, lo más importante es elegir la boquilla apropiada que puede ser de abanico o

One of the crucial aspects of biological effectiveness in field of EPF is the correct application of infectious units (conidia). Tamayo-Mejía *et al.* [14] mentioned that to achieve good results with EPF, the quantity of foliage and crop height should be considered. Many factors depend on these measurements, for example, the amount of water needed to apply conidia EPF suspension; biology of the insect to be controlled and the most susceptible developmental stage; environmental conditions where the crops are found because fungi require from 20 to 25 °C and a relatively high humidity, concentration and viability of EPF conidia, and the application equipment. In practical terms, EPF should be applied when the insects are found in the most susceptible developmental stage at a concentration close to 1×10^{13} conidia/hectare, preferably in the morning or afternoon to reduce UV effects on conidial viability. The application equipment could be a manual or motorized backpack pump, as well as a sprayer equipment attached to the tractor. The most important thing is to select the adequate

cono hueco para cubrir homogéneamente el follaje de las plantas con los conidios de los HE.

Por último, los nematodos entomopatógenos (NE) son agentes de control biológico que se utilizan principalmente en el control microbiano de plagas del suelo. Los nematodos de la familia de los Steinernematidae y Heterorhabditidae son los que se usan en el control microbiano, los cuales están asociados con la bacteria de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente. Al encontrar a su hospedero, los nematodos inyectan a estas bacterias asociadas en el interior de los insectos; esto provoca una infección generalizada (septicemia) y las larvas del insecto mueren. Los nematodos se reproducen en el interior de las larvas de los insectos, alimentándose del tejido del hospedero y de las bacterias; producen varias generaciones y emergen del cadáver en la etapa juvenil J3 o juvenil infectivo, para buscar nuevos hospederos [15]. Una característica interesante de los nematodos es la capacidad de desplazarse y buscar en el suelo a sus hospederos. Por este comportamiento se ha sugerido el uso de los NE en el control microbiano de plagas del suelo o de insectos con hábitats crípticos. En México se encuentran disponibles productos formulados con las especies *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema feltiae* y *S. carpocapse* (Cuadro 4). En larvas de gallina ciega se han probado algunas de las especies de NE antes mencionadas con una mortalidad desde el 20 al 75 % [16]. Hay ciertos problemas que limitan el uso masivo de los NE como agentes de control biológico, y uno de ellos es la producción masiva y su almacenamiento. Para producir cantidades suficientes de estos nematodos, es necesario cultivarlos masivamente en insectos vivos y luego, mantenerlos en refrigeración para posteriormente aplicarlos a las plagas del suelo. En México existen pocos productos a base de NE, de los productos disponibles participa una empresa mexicana en la producción y formulación de NE (Cuadro 4). Las aplicaciones de los nematodos se hacen en el sistema de riego o asperjándolos sobre las superficies donde se encuentran los rizófagos y de esta manera los nematodos tienen una mayor oportunidad de encontrar a las larvas de las plagas del suelo e infectarlas. En general se recomienda aplicar 25 J3/cm² para que los NE sean efectivos contra la mayoría de los insectos. Los factores ambientales determinan la eficacia de las aplicaciones de los NE, por ejemplo, los nematodos son muy sensibles a la desecación y luz UV por lo que las aplicaciones al suelo o hábitats crípticos deberá realizarse en la mañana muy temprano o por la tarde [16].

nozzle that could be flat-fan or hollow-cone to cover plant foliage with EPF conidia homogenously.

To conclude, entomopathogenic nematodes (EN) are biological control agents that are mainly used in soil microbial control of pest. Nematodes of the family Steinernematidae and Heterorhabditidae are those used in microbial control, which are associated with bacteria of the genus *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, respectively. When nematodes find their host, they inject these associated bacteria to the insect interior, which causes a generalized infection (septicemia) and insect larvae die. Nematodes reproduce in larva interior, feeding on the host tissue and bacteria. They produce several generations and emerge from dead bodies in juvenile J3 or infective juvenile to search for new hosts [15]. An interesting characteristic of nematodes is the capacity to displace themselves and search for their hosts in soil. Because of this behavior, the use of EN has been suggested in soil microbial pest control or insects with cryptic habitats. Products formulated with the species *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema feltiae* and *S. carpocapse* (Table 4) are available in Mexico. In white grub, some of the EN species previously mentioned have been tested with mortality from 20 to 75% [16]. Certain problems limit massive use of EN as biological control agents. One of them is massive production and storage. To produce sufficient quantities of these nematodes, they should be massively cultured in live insects and then maintained in refrigeration to subsequently apply them to soil pests. Few products based on EN are available in Mexico, where a Mexican company participates in EN production and formulation (Table 4). The application of nematodes is made in irrigation or spraying system on surfaces where rhizophagous insects are found, so nematodes have a greater opportunity to find soil pest larvae and infect them. In general, a dose of 25 J3/cm² should be applied to make EN effective against the majority of the insect. Furthermore, environmental factors determine the effectiveness of the EN applications. For example, nematodes are very sensitive to UV light, which is why applications to cryptic soil or habitats should be performed very early in the morning or in the afternoon [16].

Cuadro 4. Productos comerciales formulados con nematodos entomopatógenos
Table 4. Commercial products formulated with entomopathogenic nematodes

Nombre comercial	Especie	Compañía	Insecto Plaga
LARVANEM	<i>Heterorhabditis bacteriophaga</i>	Koppert	Larvas de coleópteros y lepidópteros del suelo
CAPSANEM	<i>Steinernema carpocapsae</i>	Koppert	Trozadores, barrenadores, sciáridos
NINJA SC	<i>Steinernema carpocapsae</i>	OBA México	Trozadores, barrenadores, sciáridos, gallinas ciegas
ENTONEM	<i>Steinernema feltie</i>	Koppert	Larvas de sciáridos y lepidópteros del suelo

Referencias References

- Oerke EC (2006) Crop losses to pests. J Agr Sci 144:31-43.
- Pretty J (2008) Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. Phil Trans R Soc B 363: 447-465.
- Pretty J (2018) Intensification for redesigned and sustainable agricultural systems. Science 362: eaav0294.
- Hawkins BA, Cornell HV, Hochberg ME (1997) Predators, parasitoids, and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations. Ecology 78: 2145–2152.
- Lacey LA, Frutos R, Kaya HK, *et al.* (2001) Insect pathogens as biological control agents: do they have a future?. Biol Control 21:230-248.
- Eilenberg J, Hajek A, Lomer C (2001) Suggestions for unifying the terminology in biological control. BioControl 46: 387–400.
- Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, *et al.* (2015) Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. J Invertebr Pathol 132: 1-41.
- Lacey LA (2017) Entomopathogens used as microbial control agents. In: Lacey LA (ed) Microbial Control of Insect and Mite Pests: from Theory to Practice. Academic Press, San Diego, pp. 109–124.
- Glare T, Caradus J, Gelernter W, *et al.* (2012) Have biopesticides come of age?. Trends Biotechnol 30:250-258.
- Jurat-Fuentes JL, Jackson TA (2012) Bacterial Entomopathogens. In: Vega FE and Kaya HK (ed) Insect pathology. 2nd ed. Elsevier, London, pp. 265-349.
- Bravo A, Soberón M (2021) Control biológico de plagas agrícolas de insectos. Biotecnología en Movimiento 24: 25-27.
- Sauka DH, Benintende GB (2008) Bacillus thuringiensis: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Rev Argent Microbiol 40:124-140.
- Alatorre-Rosas R, Tamayo-Mejía F (2021) Protozoarios-Microsporidia y Hongos Entomopatógenos. En: Arredondo-Bernal HC, Tamayo-Mejía F y Rodríguez del Bosque LA (ed) Fundamento y Práctica del Control Biológico de Plagas y Enfermedades. Biblioteca Básica de Agricultura, México, pp. 187-238.
- Tamayo-Mejía F, Alatorre-Rosas R, Delgado-Fernandez S, *et al.* (2021) Principios de aplicación de entomopatógenos. En: Arredondo-Bernal HC, Tamayo-Mejía F y Rodríguez del Bosque LA (ed) Fundamento y Práctica del Control Biológico de Plagas y Enfermedades. Biblioteca Básica de Agricultura, México, pp. 405-425

15. Alatorre-Rosas R (2021) Nematodos parásitos de insectos. En: Arredondo-Bernal HC, Tamayo-Mejía F y Rodríguez del Bosque LA (ed) Fundamento y Práctica del Control Biológico de Plagas y Enfermedades. Biblioteca Básica de Agricultura, México, pp. 271-309.
16. Rodríguez del Bosque LM, Hernandez-Velázquez VM, Nájera-Rincón MB, *et al.* (2015) Gallinas ciegas (Coleoptera:Melolonthidae). En: Arredondo-Bernal HC y Rodríguez del Bosque LA (ed) Casos de control biológico en México Vol. 2. Biblioteca Básica de Agricultura, México, pp. 123-139.

Capítulo X

Biocontrol de Bacterias Fitopatógenas y Deterioradoras de Alimentos Mediante Fagoterapia

Biocontrol of Phytopathogens and Food Deteriorating Bacteria by Phage Therapy

Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar¹, Gabriel Ibarra-Rivera¹, Marcela Ríos-Sandoval¹, Itzayana Alely Candelas-Delgado¹, Guillermo Alejandro Solís-Sánchez¹, Margarita Martínez-García², María Dolores García-Parra², Clemente de Jesús García-Ávila³, Luis López-Pérez⁴ y Gabriel Rincón-Enríquez^{1*}.

¹Laboratorio de Fitopatología de Biotecnología Vegetal CIATEJ; ²Tecnología de Alimentos CIATEJ; ³Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del SENASICA; ⁴Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la UMSNH. *Autor correspondencia: grincon@ciatej.mx

Introducción

Actualmente crece las especies bacterianas multirresistente a antimicrobianos, entre ellos antibióticos, compuestos a base de cobre u otros compuestos químicos, etc.; estas cepas bacterianas pueden afectar el cultivo de plantas de interés agrícola alimenticio e industrial, productos procesados provenientes de la industria como los embutidos (ejemplo salchichas), a la salud de animales de interés pecuario, así como a la salud humana. Por lo cual actualmente se buscan estrategias sustentables y que no generen resistencia en estos microorganismos dañinos para las actividades humanas. Una de estas estrategias es el empleo de los enemigos naturales de las bacterias: los bacteriófagos. Estos bacteriófagos o simplemente fagos son virus bacterianos que en uno de sus ciclos produce la muerte celular bacteriana; este ciclo conocido como lítico puede emplearse perfectamente bien en el control de las bacterias antes mencionadas lo cual se conoce como fagoterapia. En particular, en CIATEJ se han aislado y empleado bacteriófagos para el control de enfermedades de plantas de interés agrícola; se presentan dos casos, para el manejo de la mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) en el cultivo de chile y para el cancro de los cítricos (*Xanthomonas citri*). En tanto para el caso de la industria alimentaria se han aislado y caracterizado bacteriófagos para manejar bacterias ácido lácticas (BAL) que provocan el deterioro de las salchichas a nivel de vida de anaquel en los puntos de venta. En los tres casos se tienen bacteriófagos líticos capaces de inhibir el crecimiento bacteriano *in vitro*, actualmente se está elaborando estrategias para poner en marcha la fagoterapia donde se encuentra la problemática del sector productivo.

Los bacteriófagos, también llamados fagos, son virus que infectan únicamente a las bacterias. El primer reporte de la existencia de los bacteriófagos data de 1896 por Ernest Hanbury Hankin, quien informó que “algo” en el agua de los ríos Ganges y Yamuna en India había tenido una acción antibacteriana contra la bacteria que ocasionaba el cólera [1]. Posteriormente, en 1915 el bacteriólogo británico Frederick Twort describió la presencia de un agente que

Introduction

Currently, multi-resistant bacterial species to antimicrobials have been increasing; among them are antibiotics based on copper or other chemical compounds, and so on. These bacterial strains may affect food and industrial agricultural crops of interest, processed industrial products, as cold cuts (sausages), livestock, and human health. Thus the importance of searching for sustainable strategies and that do not generate resistance to these microorganisms harmful for human activities. One of these strategies is the use of natural bacterial enemies – bacteriophages. These bacteriophages are bacterial viruses that in one of their cycles cause bacterial cell death. This cycle known as lytic may be used perfectly well to control the previously mentioned bacteria, known as phage therapy. Particularly, CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.), México has isolated and used bacteriophages to control diseases in plants of agricultural interest. Two cases are dealt with in this study for managing crops with bacterial spot of pepper (*Xanthomonas vesicatoria*) and citrus canker (*Xanthomonas citri*). While in the case of the food industry, bacteriophages have been isolated and characterized to manage lactic acid bacteria (LAB) that cause sausage spoilage at point of sale shelf-life level. In the three cases, lytic bacteriophages are capable of inhibiting bacterial growth *in vitro*. Now, strategies are being made to set phage therapy in motion where the problem of the productive sector is found.

Bacteriophages, also called phages, are viruses that infect only bacteria. The first report of existing bacteriophages dates since 1896 by Ernest Hanbury Hankin, who informed that “something” in the waters of the Ganges and Yamuna rivers in India had an antibacterial action against the bacteria that caused cholera [1]. Subsequently, in 1915 the British bacteriologist Frederick Twort described the presence

infectaba y mataba bacterias, sin embargo, aunque él consideró que podía tratarse de un virus que creció y destruyó a las bacterias, no descartó la posibilidad de que solo se tratara de una etapa en el ciclo de vida de la bacteria o una enzima producida por la propia bacteria [2]. Dos años más tarde y de manera independiente, el microbiólogo francocanadiense Félix Hubert d'Hérelle del Instituto Pasteur de París anunció que había descubierto un microbio invisible antagónico del bacilo de la disentería, el cual mencionó como un microbio invisible, posiblemente un virus parásito de las bacterias; además, sugirió que este fenómeno no era específico de la disentería. D'Hérelle fue quien acuñó el término "bacteriófago", comedor de bacterias (del griego phagein = comer), realizó diversas investigaciones sobre bacteriófagos e introdujo el concepto de terapia de fagos o fagoterapia [3]. Pronto los bacteriófagos fueron utilizados como agentes antimicrobianos para tratar y prevenir infecciones bacterianas en humanos, además de controlar enfermedades en plantas, detectar patógenos y evaluar la seguridad alimentaria [4].

Los bacteriófagos, pueden estar presentes en cualquier ambiente donde se localice su hospedero bacteriano, desde suelos áridos y ambientes marinos, hasta aguas termales y alimentos [5, 6, 7, 8, 9]. Los fagos constituyen el grupo más amplio de virus en la naturaleza, la mayoría presentan una proyección proteica o cola, característica del orden de los *Caudovirales*, los cuales a su vez representan el grupo más estudiado y con mayor número de bacteriófagos descritos hasta el momento [10, 11, 12]. Los fagos como todos los virus son parásitos obligados intracelulares, es decir necesitan estar dentro de una bacteria para poder replicarse y en este sentido, los fagos han desarrollado dos fases o ciclos replicativos: lítico y/o lisogénico [13]; de los cuales el ciclo lítico es de interés en el control de las poblaciones bacterianas. En la fase lítica los fagos replican su ADN y producen nuevos fagos que son liberados al ambiente; mientras en la fase lisogénica, los genes líticos no se expresan, el ADN viral es integrado en el cromosoma del huésped y se replica junto con el ADN bacteriano, esto otorga al virus un mecanismo alternativo para hacer más copias de su genoma, para los distintos fagos el cambio de un ciclo a otro puede ocurrir mediante diferentes mecanismos, en la Figura 1 se muestra el ejemplo del ciclo de vida del fago modelo lambda, donde se pueden apreciar ambos ciclos o fases replicativas.

Como se aprecia en la Figura 1, la fase o ciclo lítico resulta de importancia para el control de poblaciones bacterianas dado que es el ciclo que tiene como fin matar a las células bacterianas. Con este descubrimiento los bacteriófagos comenzaron a aplicarse con fines médicos y después en plantas para contrarrestar bacterias fitopatógenas tales como *Xanthomonas* spp. que enferman a coliflor, chile, tomate, cítricos, nuez, entre otras; *Erwinia* spp. que enferman a zanahoria, manzana y pera; *Xanthomonas malvacearum* para combatirla en siembras de algodón; *Ralstonia solanacearum* en tomate y tabaco.

of an agent that infected and killed bacteria. However, although he considered that it could be a virus that grew and destroyed bacteria, he did not discard the possibility that it was only a stage in the life cycle of the bacteria or enzyme produced by the same bacteria [2]. Two years later and independently, the French-Canadian microbiologist Félix Hubert d'Hérelle of the Pasteur Institute of Paris announced he had discovered an invisible microbe antagonistic of dysentery bacillus, possibly a parasite virus of the bacteria. Furthermore, d'Hérelle suggested that this phenomenon was not specific of dysentery. He coined the term "bacteriophage" –bacterial eater (from the Greek phagein = eat)– and performed research on bacteriophages introducing the concept of phage therapy or [3]. Soon bacteriophages were used as antimicrobial agents to treat and prevent bacterial infections in humans besides controlling plant diseases, detecting pathogens and evaluating food security [4].

Bacteriophages may be present in any environment where their bacterial hosts are located, from arid soils and marine environments to thermal waters and food [5, 6, 7, 8, 9]. Phages constitute the widest virus group; the majority show a protein or tail projection, characteristic of the *Caudovirals*, which at the same time represent the most studied group and with the greatest bacteriophages described up to now [10, 11, 12]. Phages, as all viruses, are obliged intracellular parasites, that is, they need to be inside a bacteria to be able to replicate themselves, and in this sense, phages have developed two replicate phases or cycles: lytic and/or lysogenic [13], of which the lytic cycle is of interest in bacterial population control. In the lytic phase; phages replicate their DNA and produce new phages that are released to the environment. Whereas in the lysogenic phase, the lytic genes are not expressed. The viral DNA is integrated in the host chromosome and replicates together with the bacterial DNA, which grants the virus an alternative mechanism to make more copies of its genome. For the different phages, the change from one cycle to the other may occur by different mechanisms. Figure 1 shows the example of a lambda model phage life cycle, where both cycles or replicate phases can be appreciated.

Figure 1 shows the lytic phase or cycle, which is important for bacterial population control, given that this cycle has as final goal to kill the bacterial cells. With the discovery of the bacteriophage, their application started with medical purposes and later in plants to counteract phytopathogen bacteria, such as *Xanthomonas* spp. that gets crops ill, such as cauliflower, pepper, tomato, citrus, and nuts, among others; *Erwinia* spp. also gets carrot, apple and pear ill; *X. malvacearum* to combat in cotton sowing; *Ralstonia solanacearum* in tomato and tobacco.

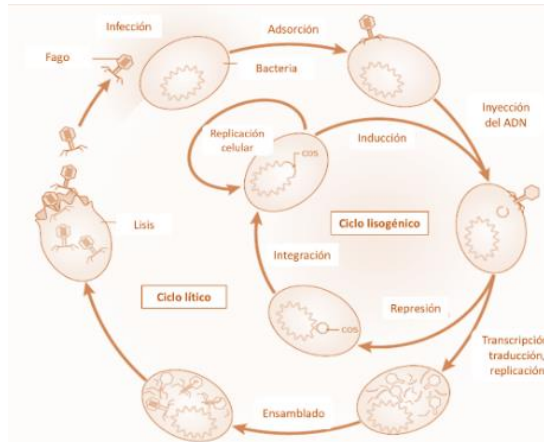


Figura 1. Ciclo replicativo del bacteriófago lambda. El fago infecta a una célula bacteriana, inyectando su ADN, en caso de entrar en la fase lisogénica el bacteriófago puede pasar al estado lítico mediante algún estímulo que promueva este cambio de ciclo (imagen modificada a partir de [13]).

Figure 1. Replicate cycle of lambda bacteriophage. The phage infects one bacterial cell injecting its DNA; in case of entering into the lysogenic phase, the bacteriophage can pass to the lytic stage by means of any stimulant that promotes this cycle change (image modified starting from [13]).

Las bacterias patógenas (de plantas, animales o humanos) o que provocan deterioro de alimentos ocasionan pérdidas significativas de productividad; por lo que surge la necesidad de buscar nuevas herramientas para su control, pero sin que perjudiquen al cultivo, al humano, a su microbioma, así como el medio ambiente. Agentes de control biológico (ACB) con esas características se están demandando en la producción de agroalimentos. Los ACB como los bacteriófagos son específicos hacia las bacterias patógenas o deterioradoras de alimentos, dado que solo infectan a su bacteria hospedera; por estas bondades se les considera que tienen relevancia biotecnológica a futuro para contrarrestar las infecciones bacterianas en humanos, animales y plantas, es decir para aplicar la fagoterapia.

En los últimos años se ha visto un resurgimiento del interés en la terapia con bacteriófagos o fagoterapia para un control biológico, debido a la naturaleza no tóxica de éstos bacteriófagos y su capacidad para infectar bacterias resistentes a antimicrobianos, por lo cual resulta recomendable sustituir métodos químicos e integrar métodos de control biológicos menos tóxicos, con énfasis en el uso de bacteriófagos como ACB contra bacterias patógenas de plantas o deterioradoras de alimentos.

En la agricultura, prácticamente cualquier cultivo de interés agrícola puede ser susceptible a determinadas bacterias fitopatógenas, ya sea en campo o en postcosecha [14]. Para el caso específico del control de enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas, el control químico es el más utilizado, el abuso extensivo de bactericidas a base de cobre o antibióticos ha generado la aparición de cepas resistentes a estos compuestos [15, 16]. Por lo cual en la actualidad diversos estudios han retomado nuevamente a la

Pathogen bacteria (plant, animal, or human) or those generating food spoilage, cause significant production loss. Thus, the need for searching new tools for their control but without affecting crops, humans, and microbiome, as well as the environment. Biological control agents (BCA) with those characteristics are in demand in agrifood production. BCA -as bacteriophages- are specific toward pathogen or food spoilage bacteria, given that they only infect their host bacteria. Because of these benefits, they are considered future biotechnological relevance to counteract bacterial infections in humans, animals, and plants, that is, applying phage therapy.

In the last years, a resurgence of bacteriophage therapy or phage therapy for biological control has been observed because of the non-toxic nature of these bacteriophages and their capacity to infect resistant bacteria to antimicrobials. Thus, chemical methods should be substituted by integrating less toxic biological control methods with emphasis on the use of bacteriophages, as BCA against decomposing plant or food pathogen bacteria.

In agriculture, practically any crop of agricultural interest may be susceptible to specific phytopathogen bacteria, either in field or postharvest [14]. For the specific control of diseases caused by phytopathogen, chemical control is the most used. However, the extensive abuse of pesticides based on copper or antibiotics has generated the emergence of resistant strains to these compounds [15, 16]. Therefore, several studies have currently retaken phage therapy as an alternative to control phytopathogen bacteria, such as *Dickeya solani* [17] and *Ralstonia*

fagoterapia como alternativa para el control de bacterias fitopatógenas como *Dickeya solani* [17] y *Ralstonia solanacearum* [18]. Tsong *et al.* [19] determinaron el efecto de los bacteriófagos en la bacteria fitopatógena *X. oryzae* y previnieron la enfermedad mediante aplicaciones preventivas a la inoculación de la bacteria. En *Xanthomonas*, el agente causal de la mancha bacteriana, se han reportado resultados favorables en *X. oryzae* pv. *oryzae* [20]; *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. axonopodis* pv. *citrumelo* [21]; *X. campestris* pv. *pelargonii* [22]. Schnabel *et al.* [23] aplicaron una mezcla de tres bacteriófagos en flores de perales y manzanos para el control de la enfermedad del fuego bacteriano ocasionada por *Erwinia amylovora*, logrando una disminución de la enfermedad del 26 al 37%. La pudrición blanda causada por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* es de las de las enfermedades en donde se ha probado el uso de bacteriófagos. También Fujiwara *et al.* [24] probaron tres bacteriófagos distintos (Φ RSA1, Φ RSB1 y Φ RSL1) y la mezcla de ellos para el control biológico de *Ralstonia solanacearum* en plantas de jitomate. Esto muestra la factibilidad del uso de la fagoterapia en la agricultura.

Mientras en la industria alimentaria, los bacteriófagos han tenido tres aplicaciones principales:

(1) como desinfectantes de superficies: la limpieza de superficies en contacto con alimentos es un tema de vital importancia en las plantas procesadoras de alimentos, por el riesgo de contaminación cruzada con patógenos peligrosos y difíciles de combatir como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp o *Escherichia coli* O157:H7, por lo que se siguen protocolos bien establecidos para ello, donde se utilizan desinfectantes químicos que poseen ciertas desventajas entre las que destacan que son poco amigables con el medio ambiente, provocan corrosión de equipos y la eliminación del microbioma no patógeno entre otros. Estas desventajas no se presentan con el uso de bacteriófagos, aunque los bacteriófagos presentan limitaciones como la alta especificidad [25] y su inhibición por parte de los demás desinfectantes por lo cual no se recomienda su uso combinado con estos. Sin embargo, su empleo se ha extendido en la industria alimentaria, por lo que ya existen formulaciones con bacteriófagos específicos naturales, es decir, no modificados genéticamente como ListShield de la compañía estadounidense Intralix el cual consiste en una solución acuosa de una mezcla de seis fagos efectivos contra *Listeria monocytogenes*. Intralix es una de las primeras compañías en obtener en 2006, para su producto ListShield, una certificación GRAS por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (*USDA por sus siglas en inglés*) [26].

(2) Durante el sacrificio de los animales para consumo humano; los patógenos procedentes de las vísceras pueden contaminar las canales durante su procesamiento. La fagoterapia representa una buena opción para reducir este riesgo; esta técnica consiste en aplicar, a los animales vivos,

solanacearum [18]. Tsong *et al.* [19] determinaron el efecto de bacteriófagos en la fitopatógena bacteria *X. oryzae* y bloquearon la enfermedad por aplicaciones preventivas a la inoculación de la bacteria. En *Xanthomonas* -el agente causal de la mancha bacteriana- favorable resultados han sido reportados en *X. oryzae* pv. *oryzae* [20]; *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. axonopodis* pv. *citrumelo* [21]; *X. campestris* pv. *pelargonii* [22]. Schnabel *et al.* [23] aplicaron una mezcla de tres bacteriófagos en flores de perales y manzanos para el control de la enfermedad del fuego bacteriano causada por *Erwinia amylovora*, logrando una disminución de la enfermedad del 26 al 37%. La pudrición blanda causada por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* es de las de las enfermedades en donde se ha probado el uso de bacteriófagos. También Fujiwara *et al.* [24] probaron tres bacteriófagos (Φ RSA1, Φ RSB1, and Φ RSL1) and their mix for the biological control of *Ralstonia solanacearum* in tomato plants. These results show the feasibility of using phage therapy in agriculture.

While for the food industry, bacteriophages have had three main applications:

(1) Surface disinfectant – cleaning food contact surfaces is a topic of vital importance in food processing facility due to the cross contamination risk with dangerous pathogens and difficulty to combat, such as *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp or *Escherichia coli* O157:H7. Thus well-established protocols are followed, using chemical disinfectants that have certain disadvantages, among which those that stand out are little environmentally friendly, causing equipment corrosion and eliminating non-pathogen microbiome, among others. These disadvantages are not present with the use of bacteriophages although they show limitations, such as high specificity [25] and their inhibition on the part of the other disinfectants, which is why their combined use is not recommended. Nonetheless, its use has extended to the food industry, so now formulations are found with natural and specific bacteriophages. In other words, these products are not genetically modified. For example, ListShield from the American company Intralix (USA) consists in an aqueous solution of a mix of six effective phages against *Listeria monocytogenes*. Intralix is one of the first companies to obtain a GRAS (Generally Recognized as Safe) certification for its ListShield product by the Food and Drug Association and the Agriculture Department of the United States (USDA in 2006) [26].;

(2) Animal sacrifice for human consumption – pathogens coming from viscera may contaminate the channels during processing. Phage therapy represents a good option to reduce this risk. This technique consists of applying phage solutions to live animals before sacrificing them [27];

(3) Fresh

soluciones de fagos antes del sacrificio [27]. **(3)** La aplicación sobre productos frescos y producto terminado: se ha logrado la reducción significativa de patógenos en productos frescos como frutas y hortalizas. En otro estudio Laurence *et al.* [28] aplicaron una mezcla de bacteriófagos específicos para la cepa 157:H de *E. coli*, en lechuga y melón recién cortados; posterior a dos días de almacenamiento se lograron reducciones estadísticamente significativas de *E. coli* respecto al control sin tratamiento. Esto muestra que en la actividad de la industria alimentaria la fagoterapia puede emplearse con éxito para prevenir pérdidas económicas de manera sustentable. Los bacteriófagos están reapareciendo como ACB, suprimiendo o sumando a los métodos convencionales para el control de enfermedades bacterianas de las plantas o deterioradoras de alimentos; por lo cual aquí se presentan tres casos estudiados en CIATEJ relacionados con la agricultura y la industria alimentaria.

Bacteriófagos para el control de la mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*)

Como ya se mencionó reglones arriba, en la agricultura las bacterias fitopatógenas son causantes de numerosas pérdidas económicas en los cultivos de interés. La mancha bacteriana es una enfermedad provocada por *Xanthomonas vesicatoria* que afecta al cultivo de chile (Figura 2) y que se presenta comúnmente en diversas zonas productoras de México. La aplicación rutinaria y excesiva de los antibióticos que son utilizados tradicionalmente para su control ha repercutido en diversas maneras al ecosistema y desde hace algunas décadas ha contribuido a la selección de cepas resistentes a antibióticos y compuestos de cobre que no solo dificultan su manejo fitosanitario, sino que conjuntamente incrementan los costos de producción. En este sentido, la fagoterapia es una alternativa ecológica y factible para el control de la mancha bacteriana. Además, puede ser utilizada en combinación con otros ACB, o bien con otros métodos fitosanitarios. Sin embargo, actualmente en el mercado mexicano no existen registros de productos a base de fagos, aunque en el mercado internacional en los últimos años diferentes compañías han patentado y comercializado productos a base de fagos para el control biológico de enfermedades de plantas. La susceptibilidad natural de los fagos a la luz UV en condiciones de campo disminuye su efectividad en el tratamiento de esta y otras enfermedades bacterianas. En el trabajo de Ibarra-Rivera [29] se determinó el efecto protector UV de cinco formulaciones evaluadas en condiciones *in vitro*. Las formulaciones se realizaron con lecitina, D-manitol, quitosano, óxido de zinc o óxido de titanio, alternando diferentes concentraciones. Los compuestos presentes en las formulaciones no afectaron la infectividad del fago ØXaF18 (bacteriófago lítico contra *X. vesicatoria*) y mantuvieron considerablemente estable las concentraciones virales durante un periodo de 230 días en

produce and finished products – pathogens have been significantly reduced by applying phage solutions on fresh fruit and vegetables and finished products. In another study, Laurence *et al.* [28] applied a mixture of specific bacteriophages for *Escherichia coli* strain 157:H in recently cut lettuce and melon; after two days of storage, statistically significant reductions of *E. coli* were observed compared to the control group without treatment. These results show that phage therapy can be used successfully in food industry activity to prevent economic loss sustainably.

Bacteriophages have been reappearing as BCA, suppressing or adding up to conventional methods to control bacterial diseases in plants or food spoilage. For this reason, three cases studied at CIATEJ related to agriculture and the food industry are discussed here.

Bacteriophages for bacterial spot (*Xanthomonas vesicatoria*) control

As previously mentioned, phytopathogen bacteria cause numerous economic losses in crops of interest. The bacterial spot is a disease caused by *Xanthomonas vesicatoria*, which affects pepper crop (Figure 2) and is commonly present in several production zones in Mexico. The routinary and excessive application of the antibiotics used traditionally for its control has had an impact on the ecosystem in different ways. A few decades ago, it has contributed to the selection of resistant strains to antibiotics and copper compounds that do not only make their phytosanitary management difficult but also increase production costs jointly. In this sense, phage therapy is an ecological and feasible alternative for the control of the bacterial spot. Moreover, it may be used in combination with other BCA or phytosanitary methods. However, no records of products based on phages currently exist in Mexican markets although different companies in the international market have patented and commercialized products based on phages for biological control of plant diseases in the last years. Natural susceptibility of phages to UV light in field conditions decreases their effectiveness in the treatment of this and other bacterial diseases. Ibarra-Rivera [29] determined the UV protector effect of five formulations evaluated in *in vitro* conditions. Formulations were performed with lectin, D-mannitol, chitosan, zinc oxide or titanium oxide, alternating different concentrations. The compounds found in the formulations did not affect the phage ØXaF18 (lytic bacteriophage against *X. vesicatoria*) infectivity and maintained the viral concentration considerably stable for a period of 230 days in warehouse at 4°C. In UV-C (254 nm) light exposure, all formulations prolonged

almacenamiento a 4°C. En la exposición a luz UV-C (254 nm) todas las formulaciones prolongaron significativamente la viabilidad del fago durante un periodo total de 60 minutos de irradiación. La formulación F4 (solicitud de patente MX/a/2019/013766) [30] presentó los resultados óptimos en ambas pruebas (Figura 2). Debido a esto, la formulación F4 fue seleccionada para ser probada en un fago lítico de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (ØBF04) muy sensible a la luz UV-C; el resultado fue el incremento significativo de la viabilidad de este fago en la formulación F4 durante la exposición a la irradiación UV-C. Posteriormente, se realizaron pruebas con plantas de chile enfermas con la mancha bacteriana en invernadero, en donde el fago ØXaF18 formulado con F4 controló significativamente la enfermedad. En experimentos de campo la adición de la formulación F4 al tratamiento con fagos ØXaF18 resultó en un incremento en la eficacia del tratamiento reduciendo significativamente la severidad de enfermedad y obteniendo resultados similares al antibiótico agrícola usado de forma tradicional en el manejo de la mancha bacteriana en el cultivo de chile.

phage viability significantly for a period of 60 min irradiation. The F4 formulation (patent application MX/a/2019/013766) [30] showed optimal results in both tests (Figure 2). Because of this result, formulation F4 was selected to be tested in lytic phage of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (ØBF04) very sensitive to UV-C light. The result was the significant viability increase of this phage in F4 formulation during exposure to UV-C irradiation. Subsequently, tests were performed with pepper plants with the bacterial spot disease in greenhouse, where the phage ØXaF18 formulated with F4 controlled the disease significantly. In field experiments, the addition of F4 formulation to the treatment with phage ØXaF18 resulted in an increase in treatment efficiency. Disease severity was reduced significantly and similar results were obtained as the agricultural antibiotic used traditionally in bacterial spot management in pepper crops.

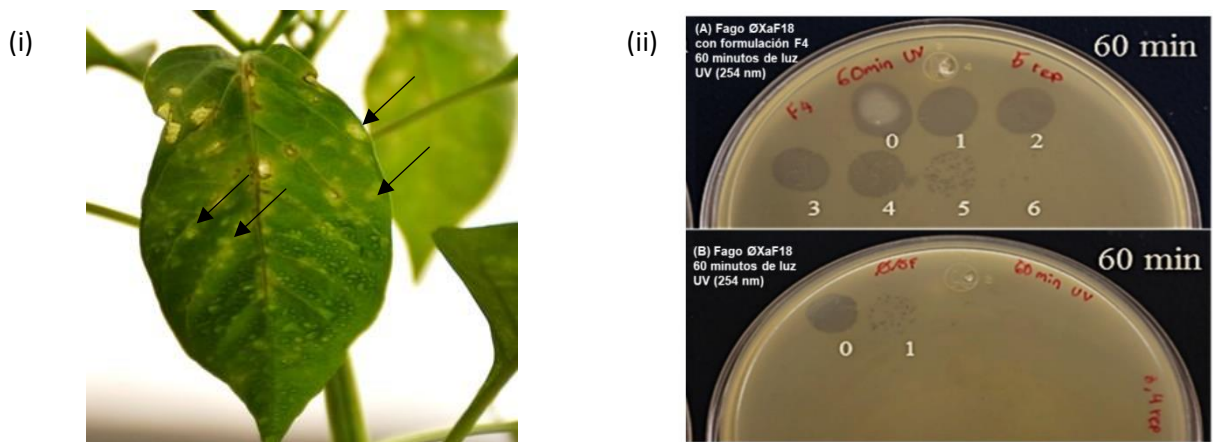


Figura 2. (i) Síntomas típicos de la mancha bacteriana en hojas del cultivo de chile bajo condiciones controladas de invernadero, las flechas negras indican áreas clorótica foliares. (ii) Efectividad biológica del bacteriófago ØXaF18 con y sin formulación F4 en condiciones *in vitro*: los números debajo de los halos de lisis indican diluciones seriales decimales 10^0 , 10^{-1} , ..., 10^{-6} del bacteriófago.

Figure 2. (i) Typical symptoms of the bacterial spot in leaves of pepper crop under controlled greenhouse conditions; black arrows indicate chlorotic leaf areas; (ii) Biological effectiveness of the ØXaF18 bacteriophage with or without F4 formulation in *in vitro* conditions: numbers under the lysis halos indicate serial decimal dilutions 10^0 , 10^{-1} , ..., 10^{-6} of the bacteriophage.

Bacteriófagos para el control del cancro de los cítricos (*Xanthomonas citri*)

Xanthomonas citri es el agente causal del cancro de los cítricos (Figura 3), una enfermedad cuarentenaria en México, considerada de alto impacto económico, social y cultural. Debido a su ausencia en el país, se toman medidas sanitarias para su detección principalmente en los estados

Bacteriophages for citrus canker (*Xanthomonas citri*) control

Xanthomonas citri is the causal agent of citrus canker (Figure 3) -a quarantine disease in Mexico- considered of high economic, social, and cultural impact. Due to its absence in the country, sanitary measurements are taken for its detection, mainly in

del norte puesto que representan un alto riesgo ya que se encuentra presente en Texas EE. UU. Durante el desarrollo del trabajo de Candelas-Delgado [31] se aisló, identificó y determinó la actividad lítica y especificidad de bacteriófagos contra *X. citri* bajo condiciones restringidas en el Laboratorio de Bacteriología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del SENASICA. Se llevó a cabo un muestreo de suelo en huertos de traspatio de limón mexicano en la frontera del estado de Tamaulipas con EE. UU. Las muestras fueron inoculadas con la bacteria *X. citri* para obtener la solución madre de bacteriófagos. Posteriormente se realizó la detección de los bacteriófagos mediante un ensayo de doble placa en agar suave, identificándose los halos de lisis presentes en un tapete bacteriano (Figura 3). Se obtuvieron 6 bacteriófagos filamentosos líticos y específicos para *X. citri*. Los fagos fueron identificados con base a su morfología por microscopía electrónica de transmisión, su naturaleza y anatomía del ADN viral, así como el tipo de halo de lisis (color y tamaño) presente en el tapete bacteriano de su hospedero. De acuerdo con la caracterización molecular de los bacteriófagos se pudo confirmar la presencia de 5 cepas diferentes de bacteriófagos. Estos resultados indican la presencia de fagos en suelos de la frontera norte mexicana, los cuales mostraron tener capacidad lítica y especificidad contra *X. citri*, lo cual para la citricultura mexicana pueden ser una alternativa para la prevención, el control y la erradicación del agente causal del cancro de los cítricos.

the northern states, because it represents a high risk since it is found in Texas, U.S.A. During the development of Candelas-Delgado [31] work, lytic activity was isolated, identified, and determined the specificity of bacteriophages against *X. citri* under restricted conditions in the Bacteriology Laboratory (Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria [SENASICA]). Soil samples were performed in backyard orchards of Mexican lemon along the border of the State of Tamaulipas with the U.S.A. The samples were inoculated with the bacteria *X. citri* to obtain a bacteriophage mother solution. Subsequently, bacteriophage detection was performed by means of double layer agar (DLA) plaque assay with soft agar procedure, identifying the lysis halos found in a bacterial mat (Figure 3). Six lytic and specific filamentous bacteriophages were obtained for *X. citri*. The phages were identified based on their morphology by electron transmission microscopy, their viral DNA nature and anatomy, as well as the type of lysis halo (color and size) found in the bacterial mat of its host. According to the molecular bacteriophage characterization, the presence of five different bacteriophage strains were confirmed. These results indicate phage presence in soils of the northern Mexican border, which showed having lytic capacity and specificity against *X. citri*. This finding can be an alternative to Mexican citrus crop for prevention, control, and eradication of the causal agent of citrus canker.

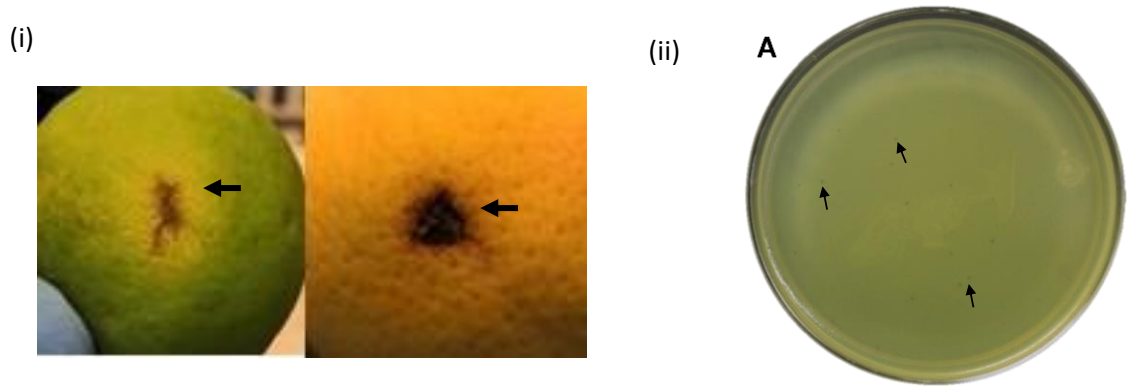


Figura 3. (i) Síntomas típicos del cancro de los cítricos en frutos de limón (izquierda) y naranja (derecha) 14 días después de la inoculación en condiciones de laboratorio de bioseguridad. (ii) Halos de lisis (indicado por flechas negras) creciendo en un tapete bacteriano de *Xanthomonas citri* lo que muestra la presencia de bacteriófagos líticos asociados a esta bacteria fitopatógena.

Figure 3. (i) Typical symptoms of citrus canker in lemon fruit (left) and orange (right) citrus canker in lemon fruit (left) and orange (right) 14 days after inoculation in laboratory biosecurity conditions; (ii) Lysis halos (indicated by black arrows) growing on a bacterial mat of *Xanthomonas citri*, which shows the presence of lytic bacteriophages associated to this battery of phytopathogens.

Bacteriófagos para el control de bacterias ácido láctica implicadas en el deterioro de salchichas

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) representan un serio problema de calidad en embutidos curados, al estar presentes en el producto terminado. Las BAL son capaces de resistir barreras de conservación como: tratamiento térmico, conservadores químicos y el envasado al vacío; lo que provee un ambiente idóneo para desarrollarse y así contribuir al deterioro de dichos productos. En el trabajo de Martínez-García [32] se lograron aislar e identificar bacterias lácticas a partir de salchichas comerciales con problemas de deterioro (Figura 4). Se obtuvieron distintas especies de BAL, de las cuales *Lactobacillus* y *Leuconostoc* han sido reportadas como deterioradoras de embutidos curados. A partir de estas BAL se aislaron 10 bacteriófagos líticos mediante la técnica de doble placa (Figura 4). Los bacteriófagos aislados fueron multiplicados hasta 10^8 UFP mL⁻¹ y se corroboró la gama de hospederos de estos bacteriófagos, a partir de esta prueba se eligieron los tres bacteriófagos con mayor capacidad lítica con las distintas BAL. El objetivo de este trabajo fue incrementar la vida de anaquel de las salchichas envasadas al vacío (más de 45 días) mediante el biocontrol de las BAL con los fagos seleccionados. Para esto se inocularon paquetes de salchichas con tres BAL (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* y *Leuconostoc mesenteroides*) y su mezcla. Después los paquetes de salchichas fueron tratados con los tres bacteriófagos seleccionados y la mezcla de ellos. Posteriormente las salchichas se envasaron al vacío en bolsas de polipropileno y se conservaron a 10°C, durante 60 días. Se midieron características, que pueden ser consideradas como de deterioro en salchichas envasadas al vacío (UFC de BAL g⁻¹ de salchicha, la acidez titulable expresada como porcentaje de ácido láctico y el pH), durante dos puntos del experimento. El primer punto fue a las 48 h después de la aplicación de los fagos; el segundo punto al final del experimento (60 días). Los resultados mostraron que a las 48 h hubo una reducción del 12 al 21% de las BAL, mientras que al finalizar el experimento solo se encontraron reducciones del 6%. Aun hace falta mejorar la estrategia para el éxito del control de las BAL a través del tiempo en salchichas, sin embargo, hay evidencias de que es posible implementar esta tecnología a base de fagoterapia para enfrentar esta problemática en la industria de los embutidos.

Bacteriophages for lactic acid bacteria implied in sausage spoilage

Acid-lactic-bacteria (LAB) represent a serious quality problem in cured sausages when they are found in the finished products. LAB are capable of resisting conservation barriers, such as thermal treatment, chemical preservatives, and vacuum-packed, which provide an ideal environment for their development and contribute to deteriorating such products. Martínez-García [32] achieved isolating and identifying lactic bacteria from commercial sausages with spoilage problems (Figure 4). Different LAB species were obtained, of which *Lactobacillus* and *Leuconostoc* have been reported as spoilers of cured meat. Starting from LAB, 10 lytic bacteriophages were isolated by the DLA plaque assay (Figure 4). The isolated bacteriophages were multiplied up to 10^8 PFU mL⁻¹, and the host range of these bacteriophages was corroborated. Starting from this assays, three bacteriophages were selected with greater lytic capacity with the different LAB. The objective of this work was to increase shelf-life of vacuum-packed sausages (more than 45 days) by LAB biocontrol with the phages selected. For this purpose, the sausage packages were inoculated with three LAB (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*) and their mix. After that, the sausage packages were treated with three selected bacteriophages and their mix. Subsequently, sausages were vacuum-packed in polypropylene bags and preserved at 10°C. At the end of the experiment, only were reductions of 6% found. The strategy still needs to be improved for the success of the LAB control in sausages through time. However, evidence exists that this technology based on phage therapy is possible to be implemented to confront this problem in the cured meat industry.

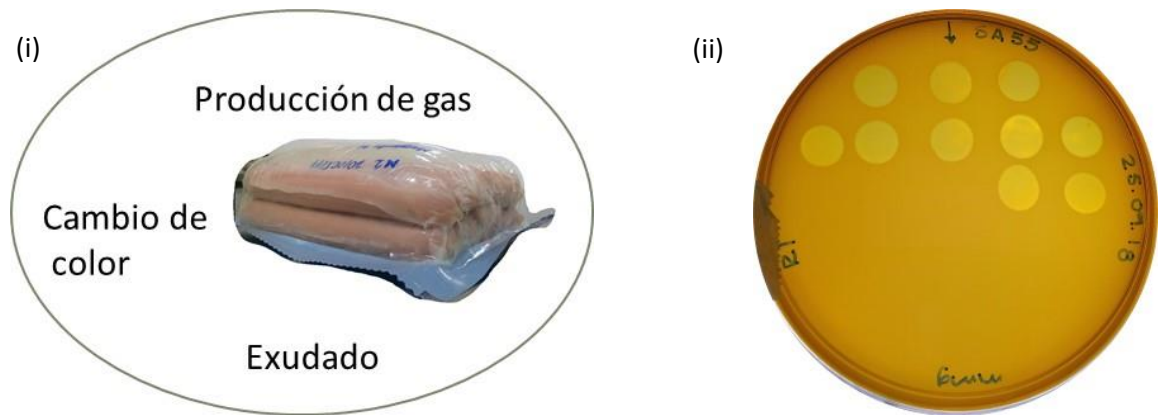


Figura 4. (i) Aspecto de un paquete de salchichas deterioradas. (ii) Actividad lítica *in vitro* de bacteriófagos asociados a bacterias ácido lácticas causantes del deterioro de las salchichas.

Figure 4. (i) Aspects of spoiled sausage package; (ii) Lytic activity *in vitro* of associated bacteriophages associated to lactic acid bacteria causal agents of sausage spoilage

Conclusión

Como se aprecia en los tres trabajos presentados anteriormente la fagoterapia es una biotecnología que se conoce desde hace más de 100 años, sin embargo, no hace más de una década que se han incrementado significativamente los estudios y la propuesta de nuevos productos comerciales a base de bacteriófagos con el fin de implementarse en la solución de problemas con bacterias patógenas de plantas, animales y de humanos, en particular contra las cepas de especies bacterianas multirresistente a antimicrobianos. Además, la fagoterapia también puede aplicarse en bacterias que causa otros problemas, por ejemplo, en la industria alimenticia con las bacterias deterioradoras.

Conclusion

The previous works have shown that phage therapy is biotechnology that has been known for more than 100 years. Nevertheless, in no more than one decade, studies and proposals for new commercial products based on bacteriophages have increased significantly with the purpose of being implemented in solving the problem with pathogen bacteria in plants, animals, and humans, particularly against antimicrobial multi-resistant bacterial species strains. Furthermore, phage therapy can also be applied on bacteria that cause other problems, for example, in the food industry with spoiler bacteria.

Referencias

References

1. Hankin EH (1896) L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. Annales de l'Institut Pasteur (in French) 10: 511-523.
2. Twort FW (1915) An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. Lancet 186: 1241-1243.
3. d'Hérelle F (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. C R Hebd Seances Acad Sci Ser D 165:373-375.
4. Pires D, Cleto S, Sillasnkorva S, *et al.* (2016) Genetically engineered phages: a review of advances over the last decade. Microbiology and Molecular Biology Reviews 80: 523–543.
5. Jończyk E, Klak M, Międzybrodzki R, *et al.* (2011) The influence of external factors on bacteriophages review. Folia Microbiologica 56: 191-200.
6. Wichels A, Biel S S, Gelderblom H R, *et al.* (1998) Bacteriophage diversity in the north sea. Applied and Environmental Microbiology 64: 4128-4133.

7. Yoon SS, Barrangou-Pouey R, Breidt F, *et al.* (2002) Isolation and characterization of bacteriophages from fermenting sauerkraut. *Applied and Environmental Microbiology* 68(2): 973-976.
8. Schoenfeld T, Patterson M, Richardson PM, *et al.* (2008) Assembly of viral metagenomes from yellowstone hot springs. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 4164-4174.
9. Abo-Senna ASM (2017) Occurrence of *Bacillus thuringiensis* bacteriophages in the egyptian arid soil. *International Journal of virology and molecular biology* 6(1): 1-8.
10. Hendrix RW (2002) Bacteriophages: evolution of the majority. *Theoretical Population Biology* 61: 471-480.
11. Ackermann HW (2003) Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology* 154:245-251.
12. Casjens SR (2005) Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages. *Current Opinion in Microbiology* 8: 451-458.
13. Campbell A (2003) The future of bacteriophage biology. *Nature Reviews Genetics* 4: 471-477.
14. Sadunishvili T, Kvesitadze E, Kve RA (2015) *Xanthomonas vesicatoria* specific virus and its potential to prevent tomato bacterial spot disease. In: Camesano T A (Eds) *Nanotechnology to aid chemical and biological defense*. Springer Netherlands pp. 34-47.
15. Carrillo-Fasio JA, García-Estrada RS, Allende-Molar R, *et al.* (2001) Sensibilidad a cobre de cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, (Doidge) Dye, en Sinaloa, México. *Rev Mex Fito* 19: 72-77.
16. Voloudakis AE, Reignier TM, Cooksey DA (2005) Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Appl Envir Microbiol* 71: 782-789.
17. Adriaenssens EM, Vaerenbergh JV, Vandenheuvel D, *et al.* (2012) T4-related bacteriophage LIMEstone isolates for the control of soft rot on potato caused by '*Dickeya solani*'. *PLoS One* 7: 1-10.
18. Tanaka H, Negishi H, Maeda H (2010) Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 53: 243-46.
19. Tsong-The K, Lu-Ching C, Chin-Nei Y, *et al.* (1971) Bacterial leaf blight of rice plant. IV. Effect of bacteriophage on the Infectivity of *Xanthomonas oryzae*. *Bot Bull Acad Sin* 12: 1-9.
20. Chan CJ, Hung NB, Yu SM, *et al.* (2014) Diversity of bacteriophages infecting *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in paddy fields and its potential to control bacterial leaf blight of rice. *J Microbiol Biotechnol* 24: 740-747.
21. Balogh B, Canteros BI, Stall RE, *et al.* (2008) Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages. *Plant Dis* 92: 1048-1052.
22. Flaherty JE, Harbaugh BK, Jones JB, *et al.* (2001) H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium. *HortScience* 36: 98-100.
23. Schnabel EL, Meyer W, Jones MP (1999) Bacteriophage of *Erwinia amylovora* and their potential for biocontrol. https://www.actahort.org/books/489/489_116.htm.
24. Fujiwara A, Fujisawa R, Hamasaki R, *et al.* (2011) Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* 77: 4155-4162.
25. Alexander S (2013) Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens. *J Sci Food Agric* 3137-3146.
26. Moye Z, Joelle W, Sulakvelidze (2018) Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses* 205.
27. Sulakvelidze A (2013) Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens. *J Sci Food Agric* 93: 3137-3146.
28. Laurence DG, Bisha B (2011) Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage* 1(3):130-137.

29. Ibarra-Rivera G (2019) Control biológico de la mancha bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*) en el cultivo de chile mediante bacteriófagos formulados. Tesis de Maestría CIATEJ. Zapopan Jalisco, México.
30. Solicitud de Patente de Invención MX/a/2019/013766. (2019) Formulación protectora contra radiación solar UV para agentes de biocontrol en cultivos agrícolas. Ibarra-Rivera G, E E Quiñones-Aguilar, E García Márquez, G Rincón-Enríquez.
31. Candelas-Delgado IA (2021) Aislamiento y caracterización de bacteriófagos purificados con nanopartículas magnéticas para tratar el cancro cítrico de *Citrus limon*, una enfermedad cuarentenaria en México. Tesis de Maestría CIATEJ. Zapopan Jalisco, México.
32. Martínez-García M (2020) Biocontrol de bacterias deterioradoras de embutidos curados cocidos mediante bacteriófagos. Tesis de Maestría CIATEJ. Zapopan Jalisco, México.



COECYTJAL
Consejo Estatal de Ciencia
y Tecnología de Jalisco

