

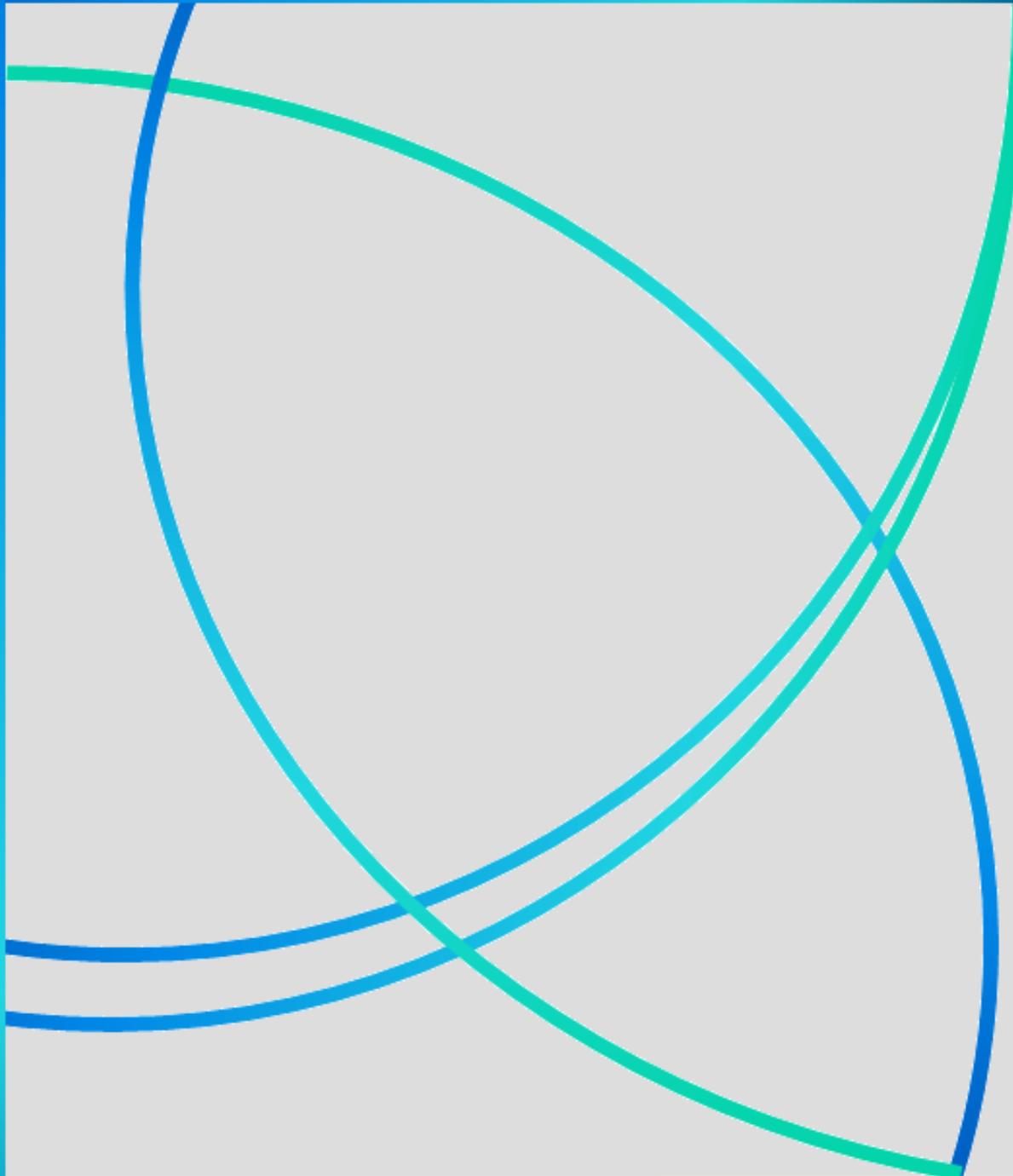
Depósito Legal ppi 201502ZU4668



Vol. 24, N° 4

Octubre - Diciembre 2016

CIEENCIA



Esta publicación científica en
formato digital es continuidad
de la revista impresa
Depósito Legal: pp 199302ZU47
ISSN: 1315-2076

**An International Refereed Scientific Journal
of the Facultad Experimental de Ciencias
at the Universidad del Zulia**

CIENCIA 24(4), 169-177, 2016
Maracaibo, Venezuela

Inducción de embriogénesis somática *in vitro* de *Medicago truncatula* 2HA

Maribel Colmenares-Esqueda* y Carlos Gimenez Alvarado

Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Biología,
Laboratorio de Biotecnología Vegetal., Apto. 506, Maracaibo 4002, Venezuela

Recibido: 01-06-15 Aceptado: 15-01-16

Resumen

Los estudios en especies leguminosas son importantes debido a que en esta familia, se encuentran algunos de los cultivos de mayor importancia agronómica a nivel mundial. *M. truncatula* es un sistema modelo para estudiar la biología de las leguminosas. Para obtener plantas de *M. truncatula* 2HA, las semillas se escarificaron mecánica y químicamente y germinaron en placas de Petri. Con la escarificación química se obtuvo un 60% de semillas germinadas y se establecieron plantas *in vitro* e *in vivo*. Se evaluó la inducción de la embriogénesis somática indirecta, utilizando como explantes hojas y raíces de plantas cultivadas *in vitro* y hojas de plantas *in vivo*. Las hojas fueron cultivadas en medio SH3 (16 μM de 2-4 D, 2 μM de, 3% de sacarosa), los callos obtenidos fueron transferidos a medio sólido SH9 (2% de sacarosa, 0,7% de agar-agar) para la formación de embriones y medio 1/2 SH9 para regeneración. Para inducir embriogénesis somática *in vitro* a partir de raíces se utilizó el medio MTR-2 (20 μM de 2-4D, 2 μM de 6-BAP, 3% de sacarosa, 0,8% de agar-agar) y MTR-3 (2% sacarosa, 0,8% de agar-agar). Concluyendo que hojas y raíces de *M. truncatula*, 2Ha son explantes competentes para inducir embriogénesis somática indirecta.

Palabras clave: *M. truncatula*, escarificación, embriogénesis somática, explantes hoja y raíz.

In vitro induction of somatic embryogenesis in *Medicago Truncatula* 2HA

Abstract

Micropropagation studies in leguminous species are relevant because the most important crops in the world belong to this family. *M. truncatula* is a model plant for studies of leguminous biology. Seeds of *M. truncatula* Jemalong 2HA were mechanical and chemical scarified to germinate it in Petri dishes. With chemical scarification sixty percent of seeds were germinated and plants were established *in vivo* and *in vitro*. Induction of indirect somatic embryogenesis was evaluated using as explants leaves and roots of *in vitro* and leaves of *in vivo* plants. Leaves were culture in SH3 media (16 μM 2-4 D, 2 μM 6-BAP, 3%, sucrose). Calli obtained from leaves were transferred to SH9 solid media (2% sucrose, 0,7% agar-agar) to induce embryo development. Embryo regeneration

*Autor para la correspondencia: mcolmenares@fec.luz.edu.ve

was in 1/2 SH9 media. MTR-2 (20 μ M 2,4-D, 2 μ M 6-BAP, 3% sucrose, 0,8% agar-agar) and MTR-3 (2% sucrose, 0,8% agar-agar) were used to induce somatic embryogenesis from roots. In conclusion, leaves and roots of *M. truncatula* 2Ha were competent explants to induce somatic embryogenesis.

Key words: *M. truncatula*, scarification, somatic embryogenesis, leaves and roots plants.

Introducción

Las leguminosas son fundamentales en el desarrollo de sistemas agrarios sostenibles debido a su capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico, a través de simbiosis con el género de bacterias *Rhizobium*, lo que les permite producir proteínas en ausencia de fertilizantes nitrogenados. Este potencial, convierte a las leguminosas en una fuente importante de proteínas y lípidos para la alimentación humana y animal (forrajera) (1).

Las especies de *Medicago* producen metabolitos secundarios de gran interés como saponinas, triterpenos, isoflavonoides, alcaloides, compuestos fenólicos y aminoácidos no proteicos. Gholami y col. (1) reportan el papel de estos metabolitos en la planta y su potencial aplicación en la industria agrícola o en la salud animal y humana. *M. truncatula* se ha convertido en un sistema modelo (2), debido a su pequeño genoma (500 Mb/1C, diploide 2n=16), es autógama y presenta un ciclo de vida corto (aproximadamente 6 meses) (3, 4). Esto ha permitido el desarrollo de estudios en diferentes campos de la biología de las leguminosas, entre los que destacan particularmente, la investigación sobre la asociación endosimbiótica con *Sinorhizobium meliloti*, incluyendo la nodulación y colonización micorrizal (5).

Otro campo a resaltar también son los estudios a nivel del control genético molecular de diversos aspectos de la

biología del desarrollo de las leguminosas como: la floración y el desarrollo del fruto. Datos que pueden ser extrapolados a otras especies de interés agrícolas estrechamente relacionadas como los guisantes y frijoles y contribuir así a mejorar la productividad agrícola de estas especies (6, 7). Adicionalmente, en esta planta modelo se han desarrollado un amplio banco de mutantes que en conjunto con la aplicación de las tecnologías ómicas (transcriptómica, proteómica, metabolómica) ha permitido el desarrollo de modelos en fisiología vegetal, conocimiento clave para el mejoramiento a futuro de las leguminosas como fuente de alimento.

Las semillas de *M. truncatula* presentan un periodo de 3-4 meses de dormancia, además de una cubierta protectora dura, que dificulta su germinación, por lo que necesitan escarificación para germinar (8, 9).

Por otra parte, la embriogénesis somática es una herramienta de gran utilidad en el cultivo de tejidos vegetales debido a que facilita el estudio, la propagación, mejoramiento y conservación de diferentes especies. El establecimiento de protocolos para desarrollar la embriogénesis somática permite aplicar diferentes métodos de transformación genética, aspecto esencial para estudiar la genómica funcional de la especie. Generalmente, los protocolos están basados en una fase de inducción de callos seguido por embriogénesis somática

y regeneración de plantas. Los genotipos de *M. truncatula*, 2HA (10) y R-108 (11), son líneas altamente embriogénicas que han sido logradas por selección recurrente de su capacidad de regeneración en cultivo *in vitro*. El genotipo 2HA se derivada del cultivar Jemalong, en donde se han realizado los mayores esfuerzos a nivel de secuenciación del genoma y bibliotecas de expresión *EST* (por sus siglas en inglés “Expressed Sequence Tag”) (12)

En este trabajo se describe la regeneración de plantas por embriogénesis somática indirecta a partir de hojas y raíz de *M. truncatula* 2HA.

Materiales y métodos

Material vegetal

Semillas de *M. truncatula* 2HA, donadas por el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de la Universidad Politécnica de Valencia, España.

Germinación de semillas

Para obtener plantas *in vitro* e *in vivo*, las semillas a germinar fueron escarificadas mecánica y químicamente. Se utilizaron 60 semillas para cada uno de los siguientes tratamientos: **T1**, control; **T2**, escarificación mecánica utilizando papel lija N° 120, hasta observar degradación de la cubierta seminal., **T3**, escarificación química por inmersión en ácido sulfúrico 96% durante 7 min, con agitación suave e inmediatamente 5 lavados con abundante agua. Para el desarrollo *in vitro*, las semillas se desinfectaron con 3% hipoclorito de sodio (NaClO), mezclando cada minuto, durante 10 min. Luego se enjuagaron 5 veces con agua estéril en una cámara de flujo laminar.

Los grupos de semillas control, escarificadas mecánica o químicamente, se colocaron en placas de Petri y papel

filtro con 10 ml de agua estéril, mantenidas en oscuridad durante 48 h a 25°C. Se registró el número de semillas germinadas al cabo de 7 días, observando la emergencia de la radícula.

Las semillas germinadas a desarrollarse *in vitro* fueron transferidas a medio de cultivo 1/2 SH9 (13) (Tabla 1), con fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad a 24/18 °C ± 2 con una intensidad lumínica de 200 µE/m²/s, con subcultivo cada 4 semanas. A partir de la cuarta semana se comienza a utilizar sus hojas y raíces como explantes.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo SH3, SH9 y 1/2 SH9 (13)

	SH3	SH9	1/2 SH9
Sacarosa	3%	2%	1%
2-4 D	16	—	—
	µM		
BAP	2 µM	—	—
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1.1 mM		0.55 mM
KH ₂ PO ₄	3 mM		1.5 mM
MnSO ₄ ·H ₂ O	6 µM		3 µM
H ₃ BO ₃	80 µM		40 µM
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	3.5 µM		1.75 µM
KI	6 µM		3 µM
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	1 µM		0.5 µM
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0.8 µM		0.4 µM
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0.4 µM		0.2 µM
Ácido Nicotínico	40 µM		20 µM
Tiamina HCl	15 µM		7.5 µM
Pyridoxina HCl	24 µM		12 µM
EDFS	0.38 mM		0.19 mM
Myo-inositol	0.55 mM		0.275 mM
pH		5.8	

EDFS: Sal sódica de Hierro (III) EDTA

Las semillas a crecer *in vivo* fueron transferidas a envases plásticos en una mezcla de arena: tierra (1:3), fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad a 24/18 °C ± 2, cubiertas con plástico transparente para mantener una elevada humedad relativa, con una intensidad lumínica de 200 µE/m²/s, durante una semana.

Progresivamente se eliminó la cubierta plástica y crecieron por 2 meses antes de comenzar a utilizarlas como fuente de explante.

Los ensayos de germinación se realizaron con 4 repeticiones de 15 semillas cada uno. Los datos presentaron una distribución normal y fueron examinados estadísticamente aplicando análisis de varianza y comparación de medias a través de la prueba de Tukey con confianza del 95% ($p < 0,05$).

Inducción de formación de callos, embriogénesis y regeneración de plantas a partir de hojas

Se utilizó la metodología reportada para *M. truncatula* R108 (13, 14), con algunas modificaciones. Se seleccionaron hojas de 4 a 6 semanas (plantas *in vitro* o *in vivo*). Para desinfectar las hojas de plantas *in vivo*, se colocaron en tubos de 50 ml (alrededor de 20 hojas) con agua y 3 gotas de jabón líquido comercial, con agitación del tubo por inversión varias veces. Luego se lavaron con agua destilada hasta eliminar la espuma del detergente. Posteriormente se les agregó hipoclorito de sodio a una concentración final de 2,5%, mezclando cada minuto, durante 16 min. Luego las hojas se lavaron con agua estéril por lo menos 4 veces en cámara de flujo laminar.

Cultivo *in vitro* de secciones de hojas de plantas *in vivo* e *in vitro*

Las hojas esterilizadas con hipoclorito de sodio y las obtenidas de las plantas *in vitro* se colocaron en placas de Petri de 9 cm con 10 ml de agua estéril y seguidamente fueron cortadas en cuadros, de máximo 8 mm², eliminando los bordes con una hoja de bisturí estéril. Las hojas cortadas se colocaron en medio de cultivo SH3 (13, 14) (Tabla 1), con el lado abaxial en contacto con el medio (Figura 1A), en oscuridad a 24°C, durante 4 a 6 semanas.

Para inducir la formación de embriones, el callo obtenido se transfirió a un medio sin hormonas (medio SH9, Tabla 1) y con 12 h luz (130 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$). Estos callos fueron transferidos a medio fresco cada 3 semanas.

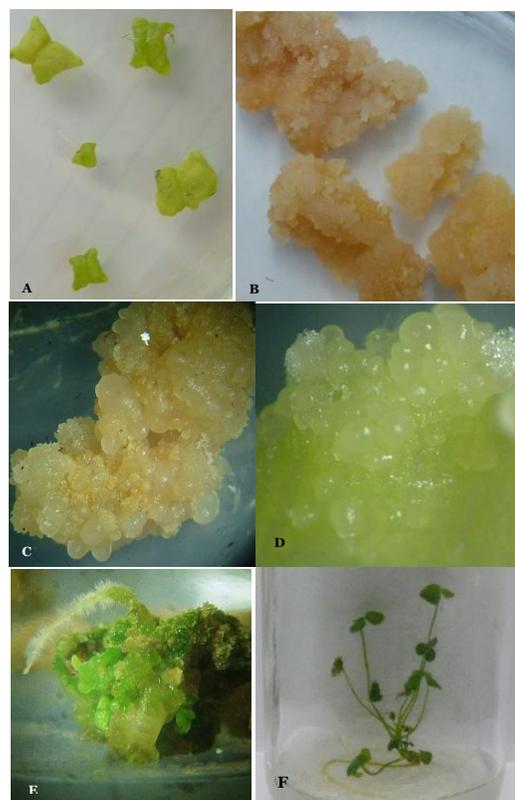


Figura 1. Obtención de callos, embriones y plantas de *M. truncatula* 2HA, a partir de hojas. **A.** explante foliar después de cortar y colocar en el medio de cultivo SH3, **B.** Callo formado luego de 4 semanas en SH3, **C y D.** formación de callo embriogénico con embriones globulares (**EG**) luego de 3 semanas en SH9 y luz, **E.** Embriones germinando en diferentes estadios del desarrollo (crecimiento del ápice radical (R), formación de folíolos) **F.** planta obtenida *in vitro*, individualizada

Los embriones germinados que han desarrollado su brote apical o ápice radical se transfirieron a medio 1/2 SH9 (Tabla 1), para promover su completo desarrollo. Las plantas enraizadas fueron transferidas a envases con sustrato esterilizado y cultivadas en condiciones de alta humedad

relativa, 12 h luz fluorescente ($200 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) y 25°C , durante unas 2 semanas.

Inducción de formación de callos, embriogénesis y regeneración de plantas a partir de raíces

Las plantas fueron removidas con cuidado del medio de cultivo ($1/2$ SH9) y se limpió el exceso de medio sólido adherido a las raíces, siguiendo la metodología reportada para *M. truncatula* R108 (15, 16). Se cortaron las raíces en segmentos de máximo 1 cm, luego fueron transferidas a medio MTR-2 (Sales Murashige y Skoog, (17) MS, suplementado con $16 \mu\text{M}$ de 2,4-D; $2 \mu\text{M}$ de 6-BAP, 3% sacarosa, solidificado con 0,8%, pH 5,8) en placas de Petri (Figura 2A) selladas con Parafilm® y mantenidas en oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Los segmentos fueron subcultivados en medio nuevo MTR-2 cada 3 semanas.

A partir de la cuarta semana el callo formado en MTR-2 (Figura 2B) se transfirió a medio MTR-3 (sales MS con 2% sacarosa y solidificado con 0,8% agar, pH 5,8), con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad a $40 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, para inducir la formación de embriones. Se subcultivó cada 3 semanas en medio fresco MTR-3.

Los embriones (Figura 2C) se cultivaron en medio MTR-3 hasta el desarrollo del brote. Luego los brotes obtenidos (Figura 2E) se transfirieron a medio MSO (sales de MS con 1% sacarosa, solidificado con 0,25% Gelrite®, pH 5,8) para inducir el enraizamiento. Estas plantas enraizadas se aclimatan igual a las provenientes de hojas.

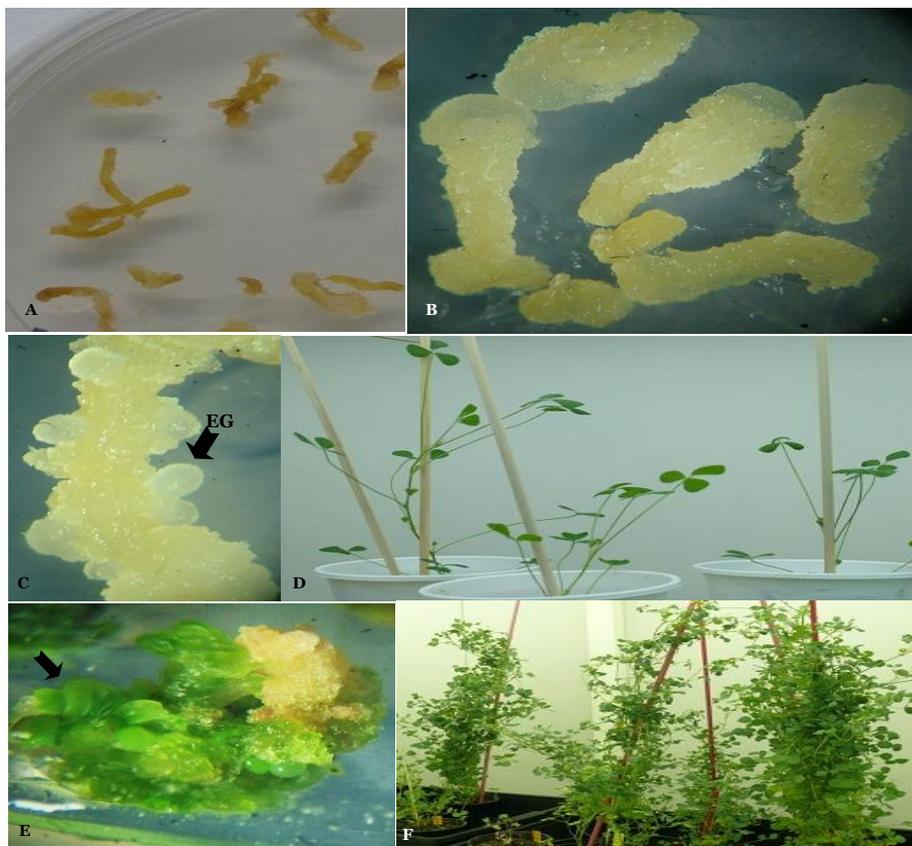


Figura 2. Obtención de callos, embriones y plantas de *M. truncatula* 2HA a partir de raíces. A) Raíces como explantes después de cortar y colocar en el medio de cultivo MTR-2, B) Callo formado luego de 3 semanas en MTR-2, C) Formación de callo embriogénico con embriones globulares (EG) luego de 3 semanas en MTR-3 y luz, D) Plantas con 5 semanas de establecidas en tierra. E) Desarrollo de embriones, iniciando la regeneración de plantas F) Plantas creciendo in vivo bajo condiciones controladas luego de 4 meses

Resultados y discusión

Germinación de semillas

En la tabla 2, se presentan los porcentajes de germinación de las semillas aplicando distintos tratamientos, se observó que la escarificación mecánica (T2) incrementó significativamente ($p < 0,05$) la germinación de las semillas. Es importante destacar que posterior a la escarificación (mecánica o química), las semillas que se cultivaron *in vitro*, fueron sometidas a un proceso previo de desinfección con 3% hipoclorito de sodio. Esto pudo afectar la viabilidad y disminuir la germinación (40%) (Tabla 2) en las semillas sometidas a escarificación mecánica. Cuando las semillas no pasan por este procedimiento de desinfección y directamente se colocan en envases con sustrato (arena: tierra 1:3) con las condiciones adecuadas se obtiene el mayor porcentaje de germinación (81%) (Tabla 2). Esto indica que la desinfección afecta la viabilidad de la semilla, por lo que se recomienda ensayar modificaciones en el procedimiento, como disminuir la concentración del NaClO o del tiempo de exposición, o aplicar otro método.

Tabla 2. Porcentaje de germinación de semillas de *Medicago truncatula* 2HA, con diferentes tratamientos de escarificación. Letras distintas indican diferencias significativas (test de Tukey, $p < 0,05$)

Tratamiento	Porcentaje de Germinación	
	Sin desinfección	Desinfección con NaClO
T1 c	3 ^d	0
T2 m	81 ^a	40 ^c
T3 q	61 ^b	60 ^b

C: control, Escarificación m: mecánica, q: química

Los mayores porcentajes de germinación (81%) se obtuvieron para la escarificación mecánica (T2) sin desinfección de la semilla. Sin embargo, la escarificación mecánica (T2) manual es

difícil estandarizar si no se cuenta con un escarificador mecánico, debido a que depende de la observación de quien la ejecute.

Con la escarificación química (T3), no hubo diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de germinación de semillas con o sin desinfección con NaClO (Tabla 2). Además, la escarificación química (T3) es el procedimiento más estándar y reproducible, convirtiéndola en el método más recomendable cuando se requieren manejar grandes cantidades de semillas en menor tiempo, sin embargo, produce desechos químicos que hay que manejar con cuidado.

Las semillas de *M. truncatula* se caracterizan por poseer una gran cantidad de ceras que la hacen extremadamente hidrofóbica. Por ello, es obligatorio escarificarlas para permitir que penetre el agua y el oxígeno necesario para la germinación, lo que permite romper el estado de dormancia de las semillas (8, 9).

Las semillas germinadas y transferidas a medio de cultivo 1/2 SH9, desarrollaron hojas y raíces que mostraron respuesta *in vitro* al ser utilizadas como explantes a partir de la cuarta semana. Las semillas germinadas, plantadas en la mezcla arena:tierra (1:3), muestran sus primeras hojas a partir de la segunda semana. Las plantas creciendo en tierra, para utilizar sus hojas como explantes para cultivo *in vitro* (ensayos de embriogénesis o transformación genética) deben tener al menos 15 cm de altura.

Formación de callos, embriones somáticos y desarrollo de plantas a partir de hojas

A partir de la segunda semana se observó el inicio de la formación de callo

en los bordes cortados de la hoja, aumentando progresivamente hacia la cuarta semana de cultivo (Figura 1 B). Wang y col. (18), reportó que estos callos se originan de la dediferenciación y proliferación de las células del mesófilo.

Según su morfología se observó la formación de diferentes tipos de callos: friable de color amarillo ocre claro, compacto y blanco. La formación de callo continuó hasta la séptima semana, con subcultivo en el mismo medio SH3. Luego, de los tres tipos de callos descritos, solo en el callo friable de color amarillo ocre claro (Figura 1B), al transferirlo a un medio sin hormonas (SH9) y en presencia de luz, se logró la inducción de embriogénesis apareciendo los proembriones a las 2 semanas y maduración de embriones a las 4 semanas de cultivo (Figura 1C y D), seguido del desarrollo de brotes (Figura 1E) a partir de los 2 meses, desde el inicio del cultivo.

Luego de iniciar su crecimiento el brote apical, se transfieren a medio 1/2 SH9, para inducir el desarrollo del ápice radical. Sin embargo, se observó deficiencia en el enraizamiento en un porcentaje aproximado del 40% de los embriones. En *M. truncatula* R108, la germinación del embrión completo se logra en el medio 1/2 SH9 (13). Sin embargo, estudios histológicos de la formación de raíz en explantes foliares de *M. truncatula* 2HA, indican que las auxinas son necesarias para inducir el desarrollo de primordios de raíz, activando la división de las células del periciclo (19). Para regular la iniciación de raíces *in vitro* de *M. truncatula* fue esencial agregar hormonas (auxinas, citoquininas, etileno) y otros compuestos bioactivos (flavonoides, glutatión) (20). Para inducir el enraizamiento de embriones somáticos a partir de callos de hojas *M. truncatula* 2HA, fue necesario añadir 10 µM ácido 1-naftalenacético (18).

Esto explica por qué los embriones somáticos diferenciados a partir de *M. truncatula* 2HA, al aplicar el protocolo de *M. truncatula* R108, tienen dificultades en desarrollar el eje radicular del embrión, mostrando dependencia el protocolo de embriogénesis con el genotipo de la planta.

En *M. truncatula* 2HA, también se ha reportado la inducción de embriogénesis somática a partir de hojas, utilizando otros medios de cultivo más complejos que incluyen la fitohormona zeatina como inductor (21); este protocolo se aplica para la transformación genética con *Agrobacterium tumefaciens*, presentando también enraizamiento limitado. Sin embargo, el protocolo descrito en este trabajo utiliza fitohormonas más económicas (2,4-D, ANA y 6-BAP) y modificando el medio de enraizamiento, se podría aumentar la eficiencia en el desarrollo de los embriones.

Inducción de formación de callos, embriones somáticos y desarrollo de plantas a partir de raíces

Para la inducción de callos, las raíces debían tener como mínimo 3 semanas y hasta 2 meses de desarrollo para obtener buena respuesta. Los callos comenzaron a formarse a partir de la segunda semana de cultivo de las raíces en oscuridad en MTR-2 (Figura 2B). Se observó la formación de callo embriogénico a partir de la cuarta semana en MTR-3 (Figura 2C), para la sexta semana se observó embriones torpedos e iniciando el desarrollo de folíolos (Figura 2E). Los callos permanecieron en MTR-3 hasta 8 semanas con subcultivo cada 3 semanas. Algunos embriones al ser transferidos a medio MSO, desarrollaron raíces en 2 semanas, mientras que otros requirieron más tiempo, e incluso algunos no las formaron. Adicionalmente, se observó que los brotes sobre la superficie del medio desarrollaron raíces, mientras que los brotes cuyo eje radicular quedaba dentro del medio no enraizaban.

Este fenómeno ha sido reportado para la línea R108 de *M. truncatula*, incluso a nivel del cultivo de microesquejes los cuales no enraízan si el extremo polar basal se sumerge en el medio, enraizando solo si se cultiva sobre el medio (14).

Tomando en cuenta este efecto, se cultivaron las plantas sobre la superficie en 1/2 SH9 con una inclinación de 45° de manera de mantener el eje apical y radical de las plantas lo mas paralelo al vector de la fuerza de gravedad, favoreciendo el crecimiento de la raíz sobre el medio. Este paso fue esencial para obtener suficientes raíces y asegurar la mayor sobrevivencia de las plantas en la fase de endurecimiento en tierra.

Se concluye con este trabajo que las hojas y raíces de *M. truncatula* 2Ha son explantes competentes para obtener embriogénesis somática indirecta. También es importante destacar que para *M. truncatula* 2Ha este es el primer reporte de embriogénesis somática a partir de raíces.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el aporte financiero al proyecto CC-334-13. Al FONACIT PEI N° 2012001382. Así como a la Dra. Cristina Ferrándiz del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas IBMCP, Universidad Politécnica de Valencia España, por el suministro de las semillas.

Referencias bibliográficas

1. GHOLAMI A, DE GEYTER N, POLLIER J, GOORMACHTIG S, GOOSSENS A. *Nat Prod Rep*, **31**, 356-380. 2014.
2. COOK D. R. *Curr Opin Plant Biol* 2(4):301-4. 1999.
3. BLONDON F, MARIE D, BROWN S, KONDOROSI A. *Genome* 37:264-270. 1994.
4. BELL CJ, DIXON RA, FARMER AD, FLORES R, INMAN J, GONZALES R, HARRISON M, PAIVA N, SCOTT A, WELLER J, MAY G. *Nucleic Acids Res* 29: 114-117. 2001.
5. BARKER DG, BIANCHI S, BLONDON F, DATTÉE Y, DUC G, ESSAD S, FLAMENT P, GALLUSCI P, GÉNIER G, GUY G, MUEL X, TOURNEUR J, DÉNARIÉ J, HUGUET T. *Plant Mol Biol Rep* 8:40-49. 1990.
6. AUBERT G, MORIN J, JACQUIN F, LORIDON K, QUILLET MC, PETIT A, RAMEAU C, LEJEUNE-HÉNAUT I, HUGUET T, BURSTIN J. *Theor Appl Genet* 112:1024-1041. 2006.
7. KALÓ P, SERES A, TAYLOR SA, JAKAB J, KEVEI Z, KERESZT A, ENDRE G, ELLIS TH, KISS GB. *Mol Gen Genomics* 272:235-246. 2004.
8. GLEVAREC G, BOUTON S, JASPARD E, RIOU MT, CLIQUET JB, SUZUKI A, LIMAMI MA. *Planta* 219: 286 - 297. 2004
9. FARIA JMR, BUITINK J, VAN LAMMEREN AAM, HILHORST HWM. *J Exp Bot* 5: 2119-2130. 2005.
10. ROSE RJ, NOLAN KE, BICEGO L. *J Plant Physiol* 155: 788-791. 1999.
11. TRINH TH, RATET P, KONDOROSI E, DURAND P, KAMATÉ K, BAUER P, KONDOROSI A. *Plant Cell Rep* 17: 345-355. 1998.
12. YOUNG ND et al., *Nature* 480:520-524. 2011.
13. COSSON V, DURAND P, D'ERFURTH I, KONDOROSI A, RATET P. *Metho Mol Bio* (Ed. Wang K.) 2/e. Humana Press Totowa, NJ. 343:115-27. 2006.
14. COSSON V, ESCHSTRUTH A, RATET P. *Method Mol Bio* (Ed. Wang K.) 3/e. Humana press. Hertfordshire, AL10 9AB, UK, 1223: 43-56. 2015.
15. CRANE C, DIXON R, WANG Z. *Method Mol Bio* (Ed. Wang K.) 2/e. Humana Press Totowa, NJ. 343:137-142. 2006.
16. CRANE C, WRIGHT E., DIXON R, WANG Z. *Planta* 223: 1344-1354. 2006.
17. Murashige, T y Skoog, F. *Physiologia Plantarum* (15) 3: 1399-3054. 1962.
18. WANG X, NOLAN K, IRWANTO I, SHEAHAN M, ROSE R. *Ann Bot London*

- 1-11. 2011 doi:10.1093/aob/mcq269.
available online
atwww.aob.oxfordjournals.org
19. ROSE RJ, WANG XD, NOLAN KE,
ROLFE BG. *J Exp Bot* 57 (10): 2227–
2235. 2006. doi:10.1093/jxb/erj187.
20. IMIN N, ROLFE BG. *Plant Signal
Behav* 2(4): 249–250. 2007
21. CHABAUD M, RATET P, ARAÚJO S,
ROLDÃO LAD, HARRISON M, BARKER
D. *Medicago truncatula handbook*,
1-34. 01/2007
[http://www.noble.org/MedicagoHandbo
ok/](http://www.noble.org/MedicagoHandbook/), ISBN: ISBN 0-9754303-1-9.



UNIVERSIDAD
DEL ZULIA

CIENCIA

Vol. 24, N° 4 (2016)

Esta revista fue producida y editada en formato digital en diciembre de 2016,
por el personal de la **Revista CIENCIA**, Oficina de Publicaciones Científicas
de la Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.

Maracaibo - Venezuela

www.luz.edu.ve

www.serbi.luz.edu.ve

produccioncientifica.luz.edu.ve

BIOLOGÍA/BIOLOGY

Inducción de embriogénesis somática in vitro de *Medicago truncatula* 2HA
In vitro induction of somatic embryogenesis in *Medicago Truncatula* 2HA 169
Maribel Colmenares-Esqueda y Carlos Gimenez Alvarado
(Maracaibo, Venezuela)

Soils with hardened laterites are they really high P-sorbing?
Los suelos con lateritas endurecidas: ¿Son realmente altamente adsorbentes de P? 178
Danilo López-Hernández
(Caracas, Venezuela)

Cuantificación e identificación de hongos filamentosos en condimentos de uso común comercializados en Cumaná, estado Sucre, Venezuela
Quantification and identification phylamentous fungi in spices of common use, commercialized in Cumana, Sucre state, Venezuela 187
Daniel José Muñoz, Crucita Graü de Marín e Hilda Marval
(Sucre, Venezuela)

Adsorción de calcio utilizando carbón activado obtenido de *Cassia fistula* y cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*)
Calcium adsorption using activated carbon obtained from *Cassia fistula* and orange peels (*Citrus sinensis*) 197
Sedolfo Carrasquero, Verónica Gutiérrez, Lily Ocando, Yenifer Ramírez, Julio Cesar Marín y Gilberto Colina
(Maracaibo, Venezuela)

QUÍMICA/ CHEMISTRY

Copolimerización de etileno con poliolefinas de cadenas largas empleando un catalizador Ziegler-Natta modificado
Copolymerization of ethylene with polyolefins of long chains using a modified Ziegler-Natta catalyst 207
Angel Morillo, Delcys Paz, Alex Méndez, Juan Chirinos, Ariana Delgado, Darmenia Ibarra y Mayamarú Guerra
(Maracaibo, Venezuela)