

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZARAGOZA



EFFECTO DE LA LUZ Y EL BALANCE HORMONAL
AUXINA/CITOCININA EN LA INDUCCION DE
CALLOS DE THEVETIA PARA LA PRODUCCION
BIOTECNOLOGICA DE CARDIOTONICOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

GRACIANO CALVA CALVA

MEXICO, D.F.

JUNIO DE 1985



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

<u>TITULO</u>	<u>PAGINA</u>
INTRODUCCION	1
I. FUNDAMENTACION DEL TEMA	
1.1. HISTORIA DE LOS CARDIOTONICOS	2
1.2. COMPOSICION Y FUENTE DE LOS CARDIOTONICOS	3
1.3. METODOS QUIMICOS PARA LA SINTESIS DE CAR DIOTONICOS	8
1.4. BIOSINTESIS DE CARDIOTONICOS	10
1.5. METABOLISMO Y ACCION INOTROPICA	12
1.6. CULTIVO DE CELULAS VEGETALES	13
1.6.1 LA FUENTE VEGETAL	16
1.6.2 EXPLANTES	17
1.6.3 DESARROLLO DE UN CULTIVO DE CALLOS	17
1.6.4 MEDIO DE CULTIVO PARA TEJIDOS DE CELULAS VEGETALES	22
1.6.5 ALMACENAMIENTO DE CELULAS VEGETA LES	26
1.7. OBTENCION BIOTECNOLOGICA DE CARDIOTONI COS POR CULTIVO DE CELULAS VEGETALES . .	28
1.8. BIOTRANSFORMACION DE CARDIOTONICOS POR CULTIVO DE CELULAS VEGETALES	30
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
3. OBJETIVOS	34
4. HIPOTESIS	35
5. MATERIAL Y METODOS	36
5.1 MATERIAL	
5.1.1 EQUIPO	36

5.1.2	MATERIAL DE VIDRIO	36
5.1.3	SUBSTANCIAS	37
5.1.4	VARIOS	37
5.2.	METODOLOGIA	38
5.2.1	RECOLECCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO	38
5.2.2	DESINFESTACION DE MATERIAL BIOLÓ- GICO	38
5.2.3	PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO . .	39
5.2.4	OBTENCION DEL EXPLANTE	41
5.2.5	SIEMBRA	42
5.2.6	DETERMINACION DEL PESO FRESCO . . .	43
5.2.7	DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS	43
5.2.8	DETERMINACION DEL PESO SECO . . .	44
5.2.9	DETERMINACION DE LA FRIABILIDAD <u>CE</u> LULAR	44
5.2.10	EVALUACION DE LA PRESENCIA DE TE- VETOSIDOS TOTALES	45
5.2.11	EVALUACION DEL CONTENIDO DE TEVE- TOSIDOS TOTALES	45
5.2.12	EVALUACION DEL PORCIENTO DE <u>CONTA</u> MINACION Y DIFERENCIACION	47
6.	DISEÑO EXPERIMENTAL Y MODELO ESTADISTICO	
6.1	DISEÑO EXPERIMENTAL	49
6.2	MODELO ESTADISTICO	54
7.	RESULTADOS	
7.1	DETERMINACION DEL TIEMPO DE DESINFESTACION Y CONCENTRACION DEL AGENTE DESINFESTANTE .	57
7.2	SELECCION DEL TAMAÑO DEL EXPLANTE MAS -- ADECUADO PARA LA INDUCCION DE CALLOS A	

	PARTIR DE DIFERENTES PARTES DE LA SEMILLA	
	DE <u>T. thevetioides</u>	59
7.3	DETERMINACION DE LA LINEARIDAD ENTRE EL <u>NUMERO</u>	
	<u>DE CELULAS Y TEJIDO CALLOSO CONTENIDO</u>	
	<u>EN UNA SUSPENSION Y SU ABSORBANCIA</u>	64
7.4	DETERMINACION DE LA CURVA PATRON DE <u>TEVETOS</u>	
	<u>TOTALES EN FUNCION DE SU ABSORBANCIA</u>	67
7.5	EVALUACION DEL EFECTO HORMONAL AUXINA(IAA)/ <u>CITOCININA(C)</u>	
	<u>Y LA LUZ SOBRE LA INDUCCION Y MANTENIMIENTO</u>	
	<u>DE CALLOS DE T.thevetioides Y SU CONTENIDO</u>	
	<u>DE CARDIOTONICOS</u>	70
7.5.1	TRATAMIENTOS QUE SOLO INVOLUCRAN A LA HORMONA	
	IAA	70
7.5.2	TRATAMIENTOS QUE INVOLUCRAN LA RELACION HORMONAL	
	IAA/C	86
7.6	RESUMEN DE RESULTADOS	109
8.	CONCLUSIONES	116
9.	PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES	118
10.	BIBLIOGRAFIA	119

INTRODUCCION

En los últimos años México ha venido sufriendo una serie de problemas socioeconómicos que han hecho necesaria la búsqueda de nuevas fuentes de fármacos. El cultivo de células vegetales es una técnica de innovación que permite la biosíntesis de NOVO, semi-síntesis y biotransformación de fármacos IN VITRO; características que la presentan como una fuente atractiva de estas sustancias.

En este trabajo se aplica dicha técnica a la planta Thevetia thevetioides la cual se conoce comúnmente con el nombre de codo de fraile y que es utilizada por el pueblo mexicano para tratar algunos problemas cardiovasculares y otras enfermedades(4). Sus principios activos más importantes son los denominados tevetósidos, sustancias identificadas como cardiotónicos que se encuentran en diferentes concentraciones según el órgano de la planta, siendo las semillas las que presentan mayor contenido(9).

Los cardiotónicos son fármacos usados terapéuticamente contra la insuficiencia cardiaca, sin embargo su margen de seguridad es muy estrecho y a pesar de los esfuerzos realizados para substituirlos por otras sustancias con un margen de seguridad más amplio aún no se encuentran dichos substitutos.

El establecimiento de un cultivo de células y la producción de sustancias por los mismos dependen de una serie de factores, como son: temperatura, aereación, pH, concentración de hormonas, fuentes de carbono y nitrógeno, sales minerales, etc., de las cuales dos de las más importantes son: luz y relación hormonal auxina/citocinina, cuyo efecto sobre la producción de tejido calloso y cardiotónicos en cultivos de células de T. thevetioides se evalúan en el presente trabajo.

1. FUNDAMENTACION DEL TEMA

1.1. HISTORIA DE LOS CARDIOTONICOS

Los cardiotónicos fueron empleados en la antigüedad como venenos por los indígenas y como medicamentos por los Romanos, Egipcios y Chinos. Estas sustancias las obtenían en forma de extractos de diversas plantas como son: Escilia, Digitalis y Estrofanfo entre otras(1).

Las propiedades medicinales de la Digitalis fueron dadas a conocer por Withering, médico Ingles, en 1775 quien la presentó como un diurético y útil contra otras enfermedades. Más tarde Cullen comprobó su virtud para combatir las enfermedades que afectan la circulación sanguínea y Fuschius le dió su nombre en base a la forma digitada de sus flores(2).

Se usó en aplicaciones locales e internas para combatir diversas enfermedades no relacionadas entre sí, desde epilepsias hasta úlceras cutáneas. Cuando se administraba como diurético se mezclaba con otras plantas de la misma especie, las cuales aumentaban y aseguraban su acción, tales como la cebolla de alborrana(Escilia) los calomelanos y el nitro(1,2).

La Digitalis se usó en 1905 en casi todas las formas farmacéuticas que se utilizaban en ese tiempo(polvo, infusión, extractos acuoso, con fécula, alcohólico, tinturas alcohólica y etérea, alcoholaturo, sacaruro y jarabe), sin averiguar los transtornos causados por la administración de dosis tóxicas. Ultimamente se ha encontrado que su valor principal radica en su eficacia para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca(1,4).

1.2 COMPOSICION Y FUENTE DE LOS CARDIOTONICOS

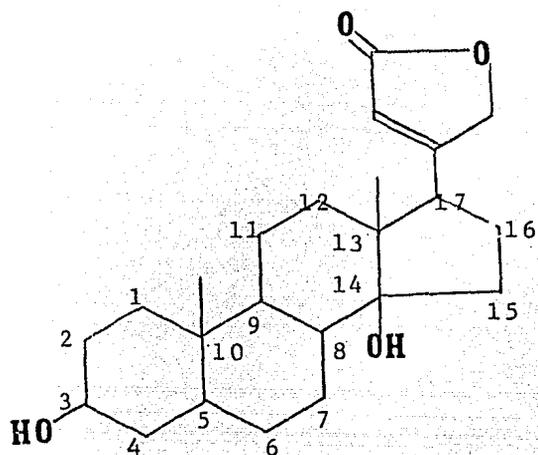
Los cardiotónicos son una combinación de una aglucona o genina con una a cuatro moléculas de azúcar. Su actividad farmacológica reside en la aglucona, sin embargo los azúcares pueden modificar la solubilidad así como la penetrabilidad en las células y por lo tanto la potencia del glucósido. La hidrólisis libera las agluconas en las que la estructura básica es un núcleo esteroidal con un anillo lactónico no saturado unido al carbono 17 (fig. 1). Este grupo contiene además radicales metilo, hidroxilo y aldehído en posiciones específicas, que varían de una especie a otra. Todas las agluconas naturales tienen un grupo hidroxilo unido al carbono 14 y a veces otro en el 3, donde se encuentran unidos los azúcares. Casi todas las agluconas naturales contienen un anillo anular en la posición 17, pero en algunos casos puede haber también un aldehído o un alcohol en la misma posición (fig. 1).

El anillo insaturado de lactona unido al carbono 17 posee estructura $\Delta^{\alpha,\beta}$ y se puede encontrar de 5 ó 6 miembros. Hay dos tipos de agluconas conocidas hasta la fecha; los cardenólidos y los bufadienólidos (fig. 1).

Las fuentes principales de cardiotónicos son las plantas de las especies de la Digitalis, Escilia y Estrofantó. En la familia de Strophantus, a la que pertenece el Estrofantó, se encuentra el árbol de Thevetia, cuyos frutos contienen glucósidos cardiacos -- llamados tevetósidos.

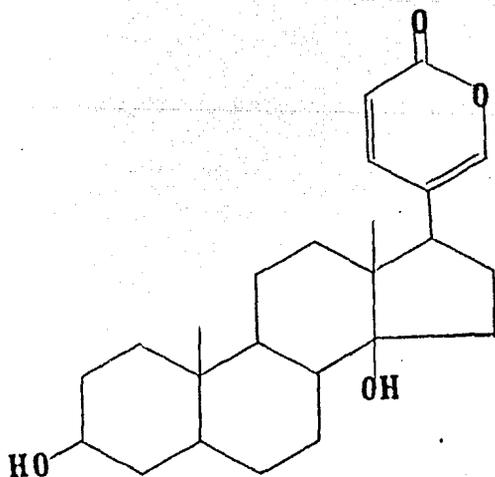
Las plantas del género Thevetia son árboles o arbustos con -- flores amarillas o anaranjadas, con corola en forma de embudo, jugo lechoso y frutos globosos de color rojo a negro y endocarpio -- como la nuez en forma redonda triangular con dos cavidades en la-

CARDENOLIDO



Digitoxigenina

BUFADIENOLIDO



Bufofotalina

Fig. 1: Tipos de agluconas o geninas.

que se localizan las semillas largas con bordes afilados. Florece de julio a diciembre(4,5,6)

El fruto de la Thevetia, conocido comunmente como codo de fraile, contiene una alta proporción de tevetósidos según estudios -- realizados por varios investigadores(4,7,8,9).

México cuenta con 6 especies del género Thevetia distribuidos en diferentes estados del país, por lo que se tiene asegurada la renovación de estas plantas productoras de cardiotónicos. Estas especies son:

- 1.- Thevetia ahouani, en los estados de Tabasco y Yucatán.
- 2.- Thevetia guemeri, en Yucatán.
- 3.- Thevetia ovata, en Sinaloa, Jalisco y Chiapas.
- 4.- Thevetia peruviana, en San Luis Potosí, Veracruz, Yucatán, Chiapas y Guerrero.
- 5.- Thevetia pleumeriaefolia, en Veracruz y Oaxaca.
- 6.- Thevetia thevetioides en Michoacán, Tamaulipas, Veracruz y Oaxaca.

Estas especies se localizan en bosques de encino, selva baja de cacifolia, selva baja de perennifolia, selva de Manilkara y en condiciones secundarias de los anteriores tres tipos y los bosques espinosos del sureste de San Luis Potosí(4).

En las semillas de Thevetia peruviana se han identificado dos cardiotónicos; la tevetina A y la tevetina B(fig. 2). Dichas semillas contienen enzimas endógenas que rompen los enlaces β -glucosídicos tanto 1-6 como 1-4, produciendo una mezcla de tevetósidos -- que son principalmente nerifolina y en menor cantidad 2'-acetilnerifolina(fig. 3). La digitoxigenina es la aglucona más simple y -- se puede obtener a partir de nerifolina y la 2'-acetilnerifolina.

R = CHO Thevetina A

R = CH₃ Thevetina B

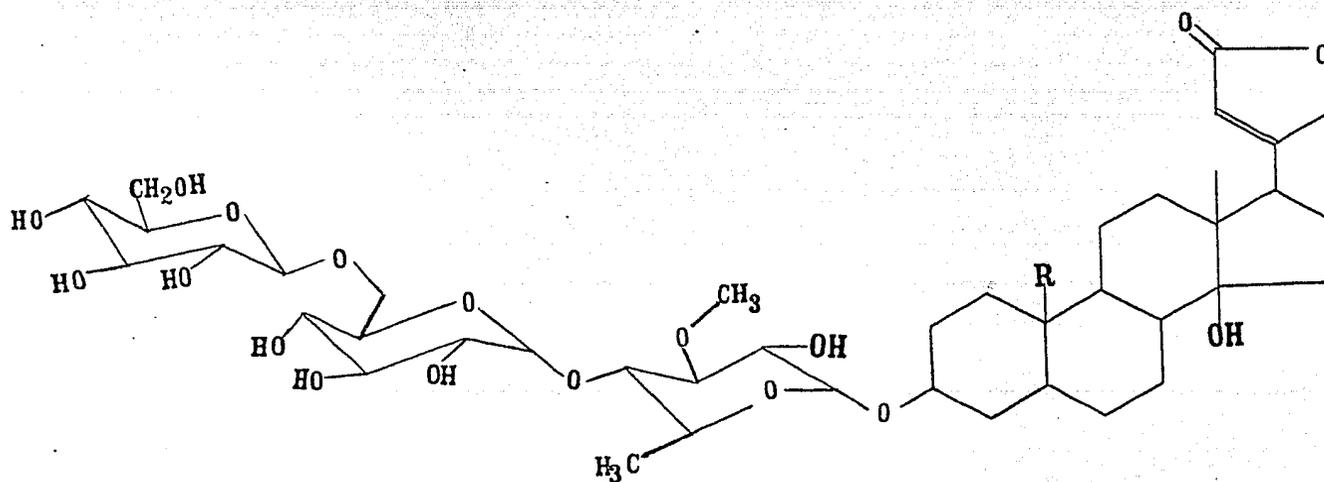
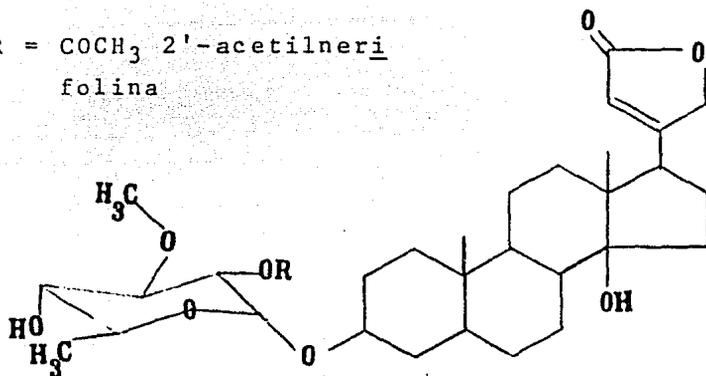


Fig. 2: Thevetinas A y B identificadas en semillas de T. peruviana.

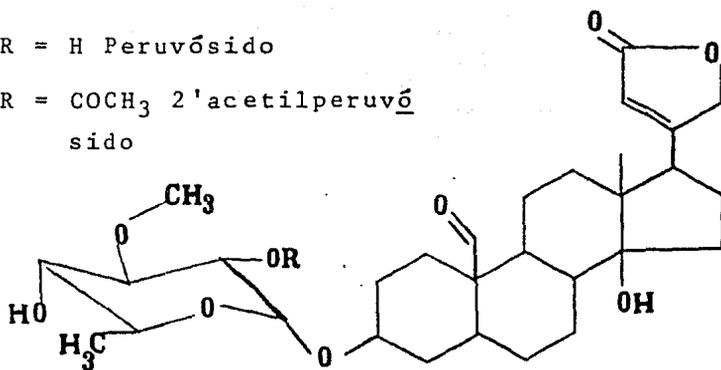
R = H Nerifolina

R = COCH₃ 2'-acetylneri
folina



R = H Peruvósido

R = COCH₃ 2'-acetylperuvó
sido



R = H Espirolactona

R = COCH₃ 2'-acetilespiro
lactona

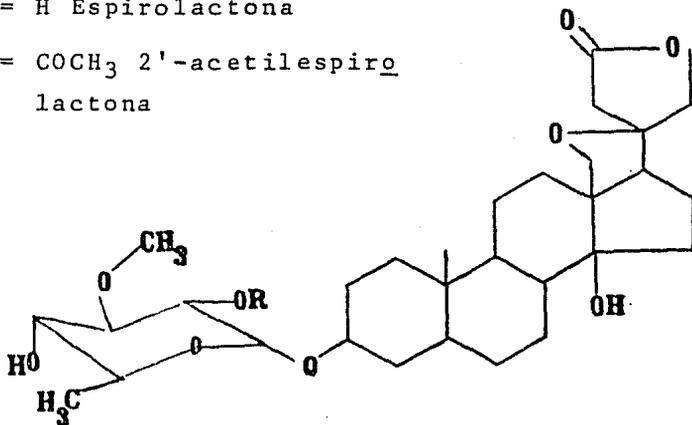


Fig 3: Tevetósidos identificados en semillas de T. peruviana.

1.3. MÉTODOS QUÍMICOS PARA LA SÍNTESIS DE LOS CARDIOTÓNICOS

Después de la extracción de la Digitalis realizada, en 1844 -- por Homolle y Querenne, no fué sino hasta los años 40 de este siglo que empezaron a aparecer algunos métodos sintéticos para la producción de cardiotónicos. No obstante no se ha encontrado ninguno que produzca rendimientos costeables.

En 1962, Danieli, Mazur y Bondehimer (10), basados en estudios preeliminares, propusieron por primera vez una técnica para la -- síntesis total de la digitoxigenina, la cual consta de 9 pasos, -- partiendo de la 3-acetoxi-5-androstan-17-ona (fig.4).

Después de la aparición de esta síntesis surgieron otras (10, 11, 12, 13, 14, 15), quienes parten de otras sustancias, pero todas ellas consisten de una gran serie de pasos para llegar al producto final con muy bajos rendimientos. Debido a esto y otras dificultades para la síntesis de cardiotónicos por métodos sintéticos las fuentes naturales siguen siendo los principales proveedores de estas sustancias.

1.4. BIOSINTESIS DE CARDIOTONICOS

En la figura 5 se presenta la ruta biosintética general de -- los cardiotónicos. De las características de esta ruta pueden deducirse algunas funciones biológicas y requerimientos nutricionales de los cardiotónicos. Los estudios sobre la biosíntesis indican que el núcleo esteroidal de los cardiotónicos se origina a -- partir del ácido mevalónico vía escualeno(16), el cual se obtiene a su vez de acetil coenzima-A.

Algunos estudios han usado sustancias precursoras marcadas -- para la biosíntesis de cardiotónicos obteniendo productos marcados (17,18,19).

Otros estudios han demostrado que los esteroides de 21 carbonos que poseen un grupo ceto en la posición 20 son precursores es pecíficos de cardiotónicos en las plantas(19).

Un aspecto importante es que todos los cardiotónicos con D-azúcares son β -glucósidos con respecto al enlace esteroide-azúcar, -- mientras los que contienen L-azúcares presentan enlaces α (20).

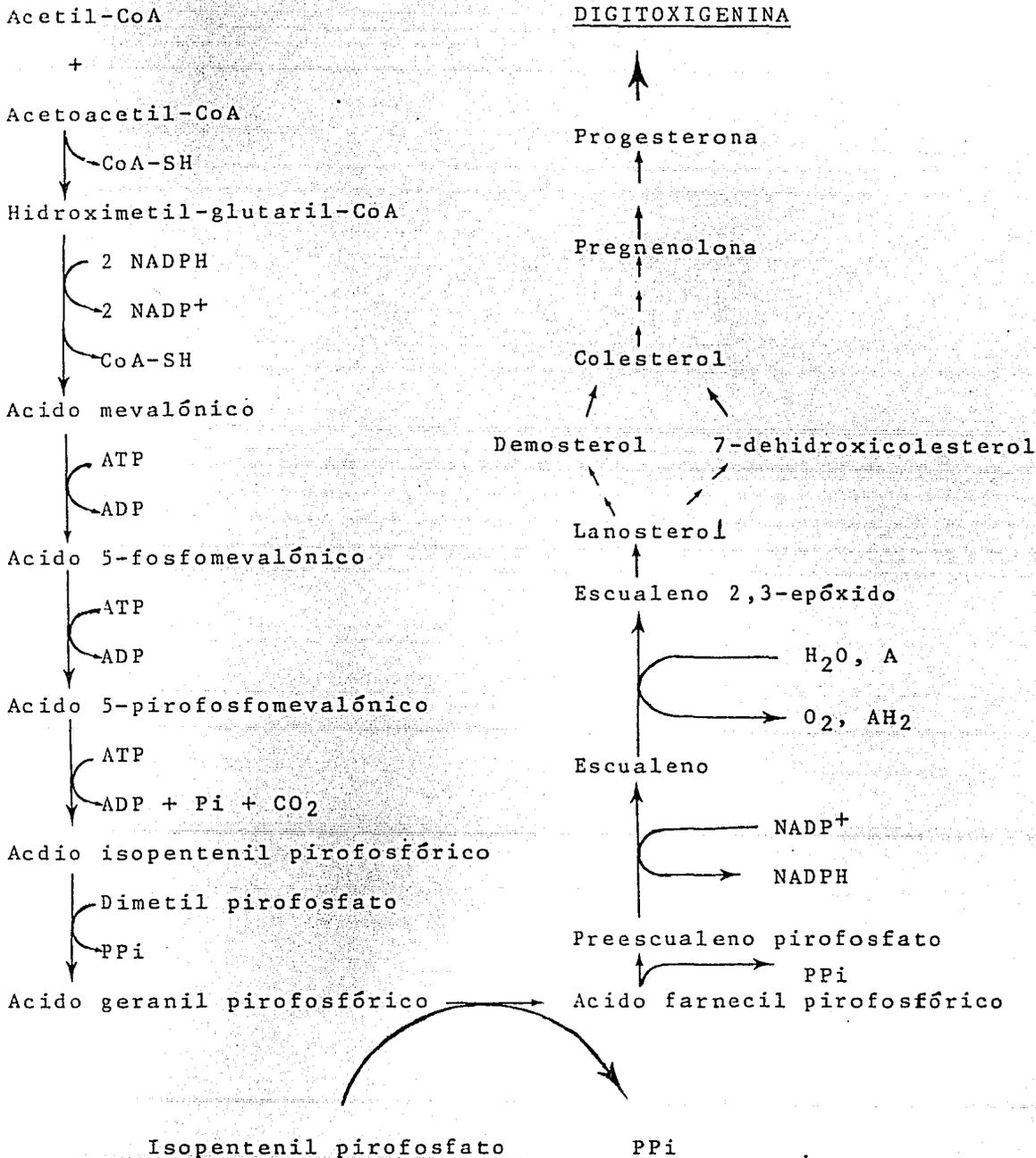


Fig. 5: Ruta biosintética de los cardiotónicos.

1.5 METABOLISMO Y ACCION INOTROPICA

La absorción por vía oral está directamente relacionada con su liposolubilidad. Su hidrosolubilidad está regida principalmente por el número de radicales hidroxilos unidos al núcleo esteroididal. Cuando los cardiotónicos se absorben del tubo digestivo y llegan a la sangre, estos se conjugan con la albúmina plásmica y se metabolizan principalmente en el hígado. Algunos cardiotónicos como la digoxina se combinan poco con la albúmina y se excretan por vía renal en forma intacta aumentando así la duración del efecto en forma proporcional a los trastornos de la función renal.

La principal propiedad farmacológica de los cardiotónicos es su poder contra la insuficiencia cardiaca, debida a su efecto de aumentar la fuerza de contracción del miocardio. Los efectos resultantes por el aumento en la fuerza de contracción (accoión inotropica positiva) son principalmente: aumento del gasto cardiaco, disminución del tamaño del corazón, de la presión venosa y del volumen sanguíneo, diuresis y alivio del edema(1).

El efecto inotropico producido por los cardiotónicos puede deberse a la inhibición de la bomba de sodio-potasio, quien depende de iones magnesio y es activada por iones de sodio y potasio. Esta bomba se encuentra en la membrana celular del músculo y se ha encontrado que los cardiotónicos se unen a ella produciendo de esa forma los efectos mencionados ademas de los toxicos.

1.6 CULTIVO DE CELULAS VEGETALES

ANTECEDENTES

A pesar de los esfuerzos realizados para la síntesis química de sustancias con actividad farmacológica, las plantas superiores son todavía la fuente más importante para la obtención de muchos compuestos de esta naturaleza. No obstante, en años recientes se ha dificultado la conservación de los vegetales, por lo que es necesario buscar una nueva fuente de fármacos. De esta forma, muchos estudios se han enfocado a la posibilidad de producir sustancias IN VITRO como metabolitos secundarios o productos semisintéticos a partir de biotransformaciones efectuadas por cultivos de células vegetales. Aunque aún no se han encontrado las condiciones adecuadas para este tipo de cultivos, se han obtenido muchos progresos en los últimos 20 años. Durante este tiempo se desarrolló el cultivo de células vegetales, concomitantemente con los de microorganismos, usando las mismas técnicas y haciendo el mismo tipo de hipótesis, por lo que muchos investigadores se refieren a este tipo de células como un nuevo tipo de microorganismos(21, 22).

El cultivo de células vegetales es la técnica para crecer células, tejidos y órganos de plantas en un medio de cultivo sintético y libre de microorganismos viables.

Hay dos grandes aplicaciones del cultivo de células vegetales: en la investigación, donde se puede utilizar para ayudar a minimizar algunas variables tales como las del medio ambiente y por otro lado las células pueden cultivarse en medios libres de microorganismos tales como bacterias, hongos, algas y posiblemente virus lo que no se puede lograr fácilmente en condiciones naturales. La segunda aplicación es la conservación de especies valio

so y como alternativa para la crianza de plantas originadas de -
líneas celulares específicas.

Una dificultad general para el cultivo de células vegetales -
es la desinfestación del tejido que va a ser usado como explante.
Otro problema es la selección de un medio de cultivo adecuado y
de las condiciones ambientales necesarias para la clase de tejido
a cultivar y el tipo de cultivo deseado. Para la mayoría de los -
propósitos de investigación y económicos, es suficiente con el -
crecimiento de callos en medio semisólido. Los callos son masas -
de células desorganizadas crecidas sobre agar. Este tipo de creci-
miento se usa más comunmente en estudios bioquímicos y de morfolo-
gía. Los callos se encuentran en la naturaleza como una respuesta
al daño mecánico o interferencia de los microorganismos o insec-
tos sobre las plantas.

Una reciente aplicación del cultivo de células vegetales es la
producción de sustancias químicamente importantes(23). Para ello,
los cultivos se pueden manipular hasta lograr extraer de ellos --
sustancias químicamente específicas, ya sea de los tejidos o del
mismo medio de cultivo.

Por otro lado, el principio de "TOTIPOTENCIA", quien establece
que cada una de las células de la planta contiene el potencial ge-
nético necesario para regenerar la planta completa, puede utili-
zarse para obtener plantas a partir de los cultivos de células o
tejidos IN VITRO.

En la búsqueda de sustancias de interes farmacéutico, los cul-
tivos de células presentan varias ventajas con respecto a los cul-
tivos tradicionales de plantas(24); estas son:

1) Los cultivos quedan disponibles para estudios en alrededor
de un año, independientemente de la distribución geográfica que -

ocupe la planta naturalmente y de las condiciones climáticas que la rigen.

2) Los ciclos de vida de los cultivos no exceden de 10-15 -- días, mientras los de las plantas naturales duran meses, e inclusi ve años(25).

3) La manipulación del cultivo, por ejemplo su almacenamiento y su extracción, es más fácil que el de los órganos de las plantas naturales.

4) Estos cultivos responden a cambios en el medio ambiente más rápida y sensitivamente que las plantas en su forma natural.

5) Los protoplastos se obtienen más fácilmente en estos culti vos que en las plantas naturales, siendo esto muy importante debi do a la ausencia de pared celular y a que no obstante esto contie nen todos los organelos de una célula normal.

Los requerimientos específicos para la nutrición de los culti vos de las células vegetales se pueden determinar en forma exacta (26). Esta determinación resulta del desarrollo de un medio adecua do simple para la iniciación de callos y el posterior estableci-- miento de un cultivo en suspensión. En la mayoría de este tipo de estudios se ha utilizado el medio de Murashige & Skoog(27) como - medio de control.

1.6.1 LA FUENTE VEGETAL

La producción sucesiva de callos y la subsecuente regeneración de la planta, está en función de la calidad del explante utilizado, quien a su vez depende de la planta o parte de ella de la cual se tomó. Hay demasiada variabilidad entre los cultivos de células vegetales IN VITRO aún usando la misma clase de plantas y entre las mismas familias. En general, la facilidad de regeneración de órganos se relaciona con la facilidad de propagación vegetativa de la planta por los métodos tradicionales. Las plantas que son difíciles de propagar vegetativamente, son también difíciles de propagar y regenerar IN VITRO.

Las plantas dicotiledóneas son las mejores formadoras de callo en la naturaleza. En cambio la formación de callos por plantas monocotiledóneas no es muy común (28,29).

Aunque el principio de totipotencia puede ser una característica general para todas las células, esta expresión se ha limitado a cierto tipo de ellas identificadas como meristemáticas por Torrey (41). Este tipo de células son aquellas que aparentemente responden a un estímulo organogenético, como por ejemplo el balance auxina/citocinina. Estas células se distinguen de las demás, en un cultivo, por su tamaño relativamente pequeño, citoplasma muy denso, forma isodiamétrica, fina pared celular, vacuolación mínima y su gran núcleo. Usualmente se encuentran como encerradas dentro de los tejidos cultivados y algunas veces como masas o nódulos de tejido preembriónico. Cuando se desea la regeneración de la planta, es necesaria la presencia de células meristemáticas o de aquellas que puedan transformarse en dichas células.

1.6.2 EXPLANTES

La técnica usual para desarrollar un cultivo de células vegetales es por medio de la formación de callos, originados a partir de explantes, que son fragmentos de tejidos de plantas. Si el explante es uniforme y consiste de un sólo tipo de células entonces el tipo de callo que se desarrolle también será uniforme y de un tipo de células. Si el explante es heterogéneo, como sucede con -- partes de semilla, raíz u hoja, el callo obtenido constará de células productos de la división de muchos tipos de ellas(28). Los principales factores que afectan la eficacia del explante son: tamaño del explante, desinfestación del tejido que se va a usar como explante. El tamaño del explante es el mayor peligro de inclusión de microorganismos contaminantes en los cultivos y durante la desinfestación del tejido debe procurarse que el tejido se dañe lo menos posible. El método más común para la desinfestación del tejido es el uso de una solución de cloro, hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio(23) o cloruro mercurioso por 5-20 minutos (generalmente con 15 minutos es suficiente)(32).

1.6.3 DESARROLLO DE UN CULTIVO DE CALLOS

El tejido de plantas más comunmente cultivado hasta la fecha es el callo quien se forma por la reacción a un daño sufrido por la influencia de medio ambiente desfavorable sobre la planta. Los callos se obtienen por cultivos de explantes sobre medios semisólidos el cual contiene por lo general alto contenido de sales, au xinas e hidrolizado de caseína u otros suplementos complejos. Una vez que se han obtenido callos friables, el tejido se transfiere a un medio líquido. Aplicando a estos últimos una agitación y aereación vigorosas se obtiene una suspensión celular. El cultivo -

de callos se mantiene generalmente en la obscuridad y a veces se agrega ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para evitar la organogénesis.

1.6.3.1 Origen de los callos

Se encuentran en la naturaleza como resultado del daño mecánico o interferencia de los microorganismos o insectos sobre las plantas.

La técnica más utilizada para inducir su formación a partir de tejidos o fragmentos de tejidos vegetales es poner el explante en contacto con un medio sólido que contenga estimuladores químicos para el adecuado crecimiento de las células.

Independientemente del origen de los callos, su iniciación y desarrollo siempre involucra una división celular vigorosa.

1.6.3.2 Inducción de los callos

En general los tejidos de yemas o raíces de semillas germinadas son el mejor material para la producción de un callo friable. Aparte de lo anterior se deben tomar en cuenta los siguientes factores para poder establecer un cultivo de callos adecuado:

a) Efecto de factores del crecimiento. Los requerimientos de hormonas del crecimiento y suplementos orgánicos para el medio de cultivo deben seleccionarse después de haber determinado el medio de sales adecuado (26).

Con respecto al uso de factores del crecimiento se puede dividir en cuatro grupos los cultivos de células productoras de callos. Los tejidos del primer grupo sólo necesitan auxina o un regulador del crecimiento semejante. El segundo grupo necesita auxina y citoquinina mientras el tercer grupo no requiere de ninguno de estos -

dos factores. El cuarto grupo es similar al primero y sólo requiere de una citocinina para la iniciación del callo(34).

Se ha observado que la relación hormonal auxina/citocinina tiene efectos muy pronunciados sobre el desarrollo y establecimiento de cultivos de células y tejidos vegetales(35,36,37,38-41).

La más activa de las citocininas sintéticas más comunes es la N6-isopenteniladenina(2iP). La N6-benciladenina(BA) produce un efecto benéfico sobre la liberación o producción de retoños IN VITRO. Hay evidencias de que la cinetina, la que es una citocinina sintética, puede degradarse por efectos de la luz(300-800 nm), por lo que se debe tener cuidado de mantener su solución en la oscuridad(23).

Las giberelinas también se han utilizado en los cultivos de células vegetales, pero generalmente suprimen la organogénesis(23).

b) Reacción a la herida. La formación de los callos es siempre una consecuencia de algún daño sufrido por la planta. En 1965, -- Fosket y Roberts(42), estudiaron el efecto de la reacción a la herida en tejidos de zanahorias en una serie de medios de cultivo. Ellos observaron que en ausencia de 2,4-D y leche de coco la división era pobre y lenta. En todas las condiciones de prueba detectaron un recubrimiento del explante, quien consistía de varias capas de células; 1) Una capa exterior de células quebradas, 2) dos capas de células inactivas, 3) una zona de división, variable en espesor, regularmente constituida de 1-6 capas de células y 4) un núcleo inerte quien no presenta división celular(42).

c) Intercambio gaseoso. Aunque el oxígeno es esencial para el desarrollo de los tejidos, en la parte periférica de los callos, no es la deficiencia de esta substancia en el centro del tejido el factor limitante de la división en las capas internas de este teji

do. En algunos cultivos se observa un aumento en la proporción de oxígeno aprovechado al inicio del cultivo y posteriormente una de clinación en el mismo.(43,44,45).

El bióxido de carbono se ha usado más bien como fuente de car bono pero no es muy decisivo en el crecimiento con respecto a la aereación.

d) Influencia de la luz. El cultivo de tejidos vegetales no es autotróficamente eficiente , por lo que, cuando se desea conservar un cultivo de callos este debe mantenerse en la oscuridad. La luz afecta fuertemente el número de células que se pueden dividir en un callo(39,46). Algunos estudios indican que la luz inhibe la di visión celular en una proporción de la células dentro del explante y estimula la diferenciación y producción de brotes(39,46).

Las características de la luz que afectan el desarrollo de las plantas en general son también las que afectan el cultivo de células vegetales. Estos aspectos se clasifican de acuerdo a Michael y Prakash como; intensidad de la luz, calidad espectral, duración - del periodo de exposición diaria. Prolongadas irradiaciones de luz pueden dañar el tejido(47).

1.6.3.3 Modelo de crecimiento de los callos

El desarrollo de los callos se puede dividir en tres etapas. La primera es la fase lag, en ella el tamaño celular permanece - constante y comprende desde la inoculación hasta el primer momento en que se presenta un aumento en el número de células. La duración de esta fase varía con el origen y estado fisiológico del tejido utilizado.

La segunda fase, fase de división, se caracteriza por la dismi nución del tamaño celular y se inicia con la división de las célu-

las de las capas mas externas del tejido. Después de cierto tiempo el tejido continúa en división en forma indiferenciada. El desarrollo celular se prolonga y se presenta la tercera etapa que está determinada por el crecimiento del tamaño de las células y aparición de diferenciación celular por la maduración de las células. Esta tercera etapa se llama etapa de diferenciación y es durante ella que aparecen estructuras anatómicas distintas quienes se diferencian cada vez mas hasta parecer órganos.

En estudios recientes se ha propuesto que la fase lag se termina con el comienzo de una división celular asincrónica (25). Después de la fase lag y como resultado de la activación celular, -- hay un aumento brusco y de tipo exponencial en el número de células que termina en una meseta que a su vez finaliza con otro aumento brusco en el número de células (figs. 6 y 7).

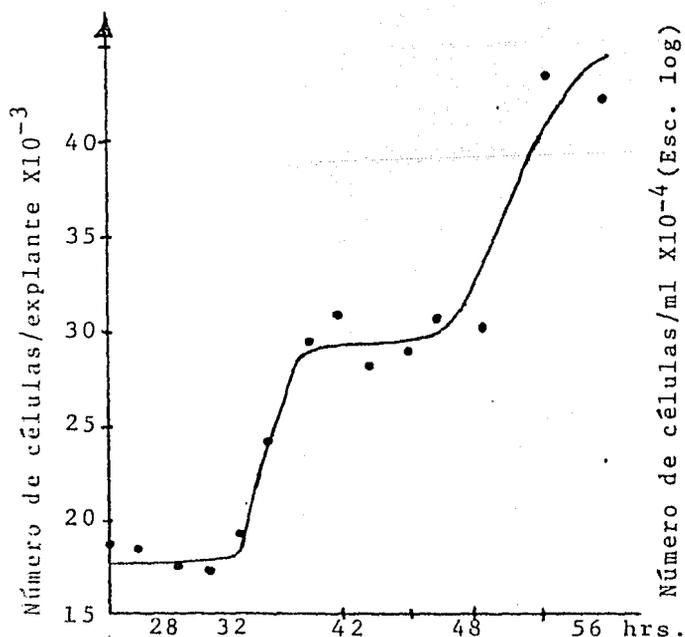


Fig. 6 Cambios en el número de células de explantes de Jerusalem artichoke (28).

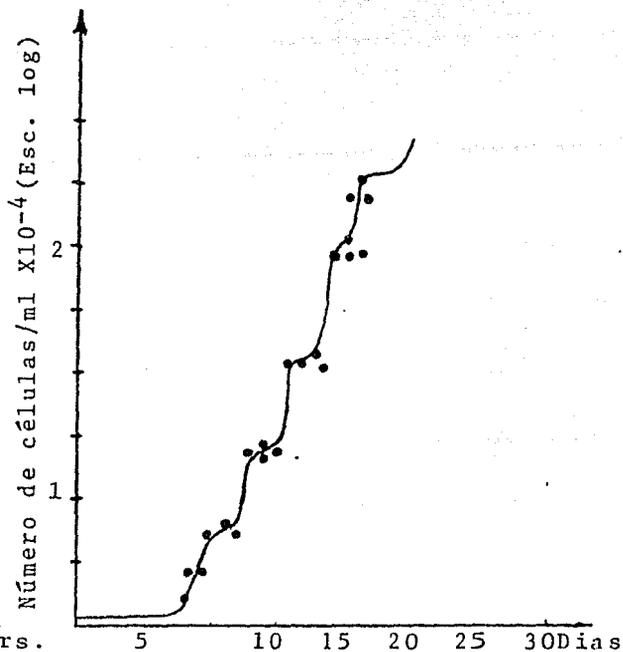


Fig 7. Cambio en el número de células con el tiempo en cultivos sincronizados (25).

1.6.3.4 Morfología de los callos

Las células de los callos, individualmente son mucho más grandes que las células de las bacterias o esporas de los hongos, pero al igual que cualquier cultivo de microorganismos presenta una gran variedad de formas y tamaños que van desde esféricas hasta casi cilíndricos. Las dimensiones de las células de los callos están en el rango de 20-40 micras de diámetro y 100-200 micras de largo. El tiempo de duplicación de las células vegetales está entre 20-40 horas, excediendo el de las bacterias por un factor de 60-100.

1.6.4 MEDIOS DE CULTIVO PARA TEJIDOS DE CELULAS VEGETALES

Los cultivos de células vegetales son raramente autotróficos. Es decir, necesitan de macro y microelementos como cualquier cultivo hidropónico. Las células y tejidos de plantas generalmente necesitan de una fuente de carbono, vitaminas y hormonas de crecimiento para plantas que IN VIVO se sintetiza por una parte u órgano de la planta para luego transportarse a otros órganos donde se metabolizan.

Los medios de cultivo para tejidos vegetales constan de cinco grupos de ingredientes: Nutrientes inorgánicos, fuente de carbono, vitaminas, hormonas de crecimiento, y suplementos orgánicos. En las tablas I y II se dan algunos de los medios de cultivo mas utilizados en cultivos de células vegetales.

Los nutrientes inorgánicos son sales minerales que contienen principalmente; I, B, Mn, Zn, Mo, Cu, Co, Ni, Fe, Ca, Mg, P, S, Na, y K. El Cl necesario se agrega junto con estos elementos.

De las vitaminas probadas hasta la actualidad sólo la tiamina es necesaria para el crecimiento de algunas células vegetales IN VITRO. El ácido nicotínico y la piridoxina también ayudan al cre-

TABLA I

SALES MINERALES QUE CONTIENEN DIFERENTES MEDIOS PARA
CULTIVO DE CELULAS Y TEJIDOS DE PLANTAS

SALES	MS(27) ¹		ER(26) ²		BS(26) ³		SH(26) ⁴		HF(26) ⁵	
	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
NH ₄ NO ₃	1650	20.6	1200	15						
KNO ₃	1900	18.8	1900	18.8	2500	25	2500	25		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	3	440	3	150	1	200	1.4	75	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	1.5	370	1.5	250	1	400	1.6	250	1
KH ₂ PO ₄	170	1.25	340	2.5						
(NH ₄) ₂ SO ₄					134	1				
NH ₄ H ₂ PO ₄							300	2.6		
NaNO ₃									600	7
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O					150	1.1			125	0.9
KCl									750	10
Micronutrientes	mg/l	mcM	mg/l	mcM	mg/l	mcM	mg/l	mcM	mg/l	mcM
KI	0.83	5			0.75	4.5	1	6	0.01	0.06
H ₃ BO ₃	6.2	100	0.63	10	3	50	5	80	1	16.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	100	2.23	10					0.1	0.5
MnSO ₄ ·H ₂ O					10	60	10	60		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	30			2	7	1	3.5	1	3.5
Zn versenate			15	37						
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	1	0.25	0.1	0.25	1	0.1	0.4		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	.025	0.1	.0025	.01	.025	0.1	0.2	0.8	0.03	0.12
CoCl ₂ ·6H ₂ O	.025	0.1	.0025	.01	.025	0.1	0.1	0.4		
AlCl ₃									0.03	0.22
NiCl ₂ ·6H ₂ O									0.03	0.13
FeCl ₃ ·6H ₂ O									1	3.7
Na ₂ EDTA	37.3	100	37.3	100	37.3	100	20	55		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	100	27.8	100	27.8	100	15	55		
Sararosa(g)	30		40		20		30			
pH	5.7		5.8		5.5		5.8			

1,2,3,4,5. Veanse estas claves en la tabla II, pag. 24.

TABLA II

CANTIDADES Y CLASES DE VITAMINAS, HORMONAS Y SUPLEMENTOS
SUGERIDOS PARA LOS MEDIOS DE LA

TABLA I

COMPUESTO	MS(27) ¹	ER(26) ²	B5(26) ³	SH(26) ⁴	HE(26) ⁵
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
Inositol	100		100	1000	
Acido Nicotínico	0.5	0.5	1	5	
Piridoxina HCl	0.5	0.5	1	0.5	
Tiamina HCl	0.1	0.5	10	5	
Glicina	2	2			
IAA ^a	1-30	-			
NAA ^b		1			
Cinetina	0.04-10	0.02	0.1		
2,4-D ^c			0.1-1	0.5	
p-CPA ^d				2	

1 Murashige & Skoog; 2 Erisson; 3 medio B5; 4 medio de Shenk & Hildedebandt; 5 medio de Heller. a ácido indol acético; b ácido naftalenacético; c ácido 2,4-diclorofenoxiacético y d ácido p-clorofenoxiacético.

cimiento de este tipo de células.

Cuando los nutrientes inorgánicos no son suficientes o adecuados para el crecimiento, se agrega al medio un hidrolizado de proteínas (por ejemplo el hidrolizado enzimático de caseína) para establecer el cultivo celular. Se puede utilizar también l-glutamina en concentraciones de 2-10 mM.

Los aminoácidos que proporcionan mejores resultados son: l-arginina, ácido aspártico, l-asparagina, ácido l-glutámico y l-glutamina (23,26).

De las hormonas del crecimiento más utilizadas se tienen a -- las auxinas, citocininas, giberelinas y al etileno. De las auxinas la más utilizada es el ácido indol acético (IAA) que es un ácido -- más débil que el ácido naphthalenacético (NAA) otra auxina también muy utilizada. De las auxinas más importantes de origen sintético, en cultivo de células vegetales destaca el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) porque suprime fuertemente la organogénesis de tal forma que permite mantener el tejido calloso en forma indiferenciada. Del grupo de las citocininas la más activa es la N⁶-isopenteniladenina (2iP). Otra de ellas, la N⁶-benciladenina (BA), es poco usada en el cultivo de células vegetales. Sin embargo, la citocinina más utilizada en el cultivo de células vegetales es la cinetina (C), una citocinina sintética que es afectada por la luz en el rango de longitud de onda de 300-800 nm. El desarrollo de callos, raíces, yemas o brotes está determinado por la relación hormonal auxina /citocinina (35,36,37,39 40).

Las fuentes de nitrógeno más utilizadas son las sales de amonio y nitratos, sólo o combinados.

Para la mayoría de las células vegetales la fuente de carbono --

preferida es la sacarosa en concentraciones del 2-6%. No obstante esta substancia se puede substituir por sus monosacáridos, glucosa o fructosa en las mismas concentraciones. Su metabolismo se efectua por vía glucólisis, ciclo de Krebs y la ruta de las pentosas.

El pH inicial en los medios de cultivo para células vegetales es de 5-6, pero al transcurso del tiempo tiende a disminuir a 4 ó a aumentar a 7 dependiendo del tipo y clase de células. Para establecer el pH inicial generalmente se usa un amortiguador de fosfatos en concentraciones de 1-5 mM(53).

1.6.5 ALMACENAMIENTO DE CELULAS VEGETALES

Para la conservación de las células vegetales en estado quístico, es decir sin que presenten división celular, es necesario inmovilizarlas metabólicamente lo más que sea posible. Con este objetivo se han desarrollado varios métodos de acuerdo a los propósitos para los que se requiere el cultivo. Los principales métodos son: Conservación a temperatura de refrigeración(0-10°C), recubrimiento con aceite mineral y almacenamiento a temperaturas criogénicas. La primera técnica sólo es útil para prolongar un poco el período de subcultivo que por lo común es de 1-2 meses.

En el recubrimiento con aceite mineral el medio de cultivo se cubre con una capa de aceite mineral de 5-40 mm de espesor. La velocidad de crecimiento en estas condiciones es constante pero mucho más lenta con respecto a las condiciones de cultivo normales.

El tercer método se basa en que la cinética de las reacciones químicas de los sistemas biológicos indican que mientras más baja es la temperatura, menor es la velocidad de reacción. Las temperaturas usadas para el almacenamiento criogénico de células son: la del nitrógeno líquido(-196°C) o la del vapor de nitrógeno lí-

quido (-140°C). Estas temperaturas se usan por tres razones: 1) La temperatura que se alcanza es adecuada para el almacenamiento prolongado de las células (1-5 años); 2) el nitrógeno líquido y sus contenedores se encuentran comercialmente disponibles y 3) la reactividad del nitrógeno líquido es muy baja comparada con la del oxígeno líquido.

La viabilidad de las células después del tratamiento para el almacenamiento criogénico, está influenciada por el tipo de células, naturaleza y concentración de la substancia crioprotectora, la velocidad de congelación, velocidad de descongelación y los métodos para determinar la viabilidad celular (50,52).

1.7 OBTENCION BIOTECNOLOGICA DE CARDIOTONICOS POR CULTIVO DE CELULAS VEGETALES

La técnica de cultivo de células vegetales se ha usado en los últimos años para la obtención biotecnológica de fármacos, ya sea por biosíntesis, que involucra la síntesis de NOVO de algún compuesto orgánico por las células del medio de cultivo, o mediante transformaciones de sustancias agregadas al medio. Por medio de esta técnica se han obtenido sustancias como los cardiotónicos, usando principalmente géneros de Digitalis y menos frecuentemente de Thevetia(54,55,56). Estudios sobre los requerimientos nutricionales para el cultivo de D. lanata y D. purpurea indican que el hidrolizado enzimático de caseína inhibe el crecimiento quien es mejor cuando se usa un medio suplementado con auxinas(54). Algunos investigadores(56) mencionan el establecimiento de cultivos de de callos o células de Thevetia en suspensión, pero no detallan la técnica que usaron para ello.

Varios investigadores han estudiado la síntesis de cardiotónicos usando cultivos de células vegetales en los últimos años(38, 39,40,56-62) pero otros de ellos no han detectado este tipo de sustancias en sus cultivos(60,62,63,68,66,67,58), y en otros casos sólo se han encontrado cantidades muy pequeñas(38-40,56,58,-69). De los estudios anteriores, los que utilizan órganos diferenciados han obtenido mejores cantidades de estas sustancias.

Se han realizado estudios sobre los efectos de las auxinas en la producción de cardiotónicos(54), con el fin de encontrar las concentraciones adecuadas de estas sustancias para la biosíntesis de los primeros. En estos, se ha llegado a que la adición de algunos precursores de los cardiotónicos, unido al efecto de las auxinas, aumentan la producción de cardiotónicos(69,70), aunque

algunos de dichos precursores puede resultar ser tóxico para el cultivo(69).

Otros investigadores evaluaron el efecto de los cloroplastos (obtenidos por exposición del cultivo a la luz) y de algunas -- sustancias reguladoras del crecimiento(39,69), encontrando que los cloroplastos no son esenciales en la producción de cardiotóxicos, para los tejidos de las plantas que usaron(D. purpurea), y que las concentraciones óptimas de las hormonas que probaron -- fueron: BA 0.01 ppm, NAA 0.1 ppm y 2,4-D 0.01 ppm.

También se ha observado que la edad de los cultivos es muy -- importante para la producción de cardiotóxicos, ya que al parecer disminuye con respecto al tiempo, e inclusive puede llegar a desaparecer(56), mientras en otros casos puede aumentar con el tiempo si los cultivos se suplementan con algunas hormonas del crecimiento(40).

1.8 BIOTRANSFORMACION DE CARDIOTONICOS POR CULTIVOS DE

CELULAS VEGETALES

La biotransformación de cardiotónicos usando cultivos de células vegetales, ha sido estudiada en los últimos años por muchos investigadores usando principalmente tejidos de Digitalis(22,57,-70,72,73-76) y sólo algunos con Thevetia(72) y otros géneros como Daucus carota, Canabis sativa e Ipomea sp(77,78).

Las principales biotransformaciones efectuadas sobre los cardiotónicos son: glucosilación, desglucosilación, acetilación, --desacetilación, 12- -hidroxilación, 5- -hidroxilación, reducción y oxidación. Algunos ejemplos de estas reacciones se muestran en la figura 8.

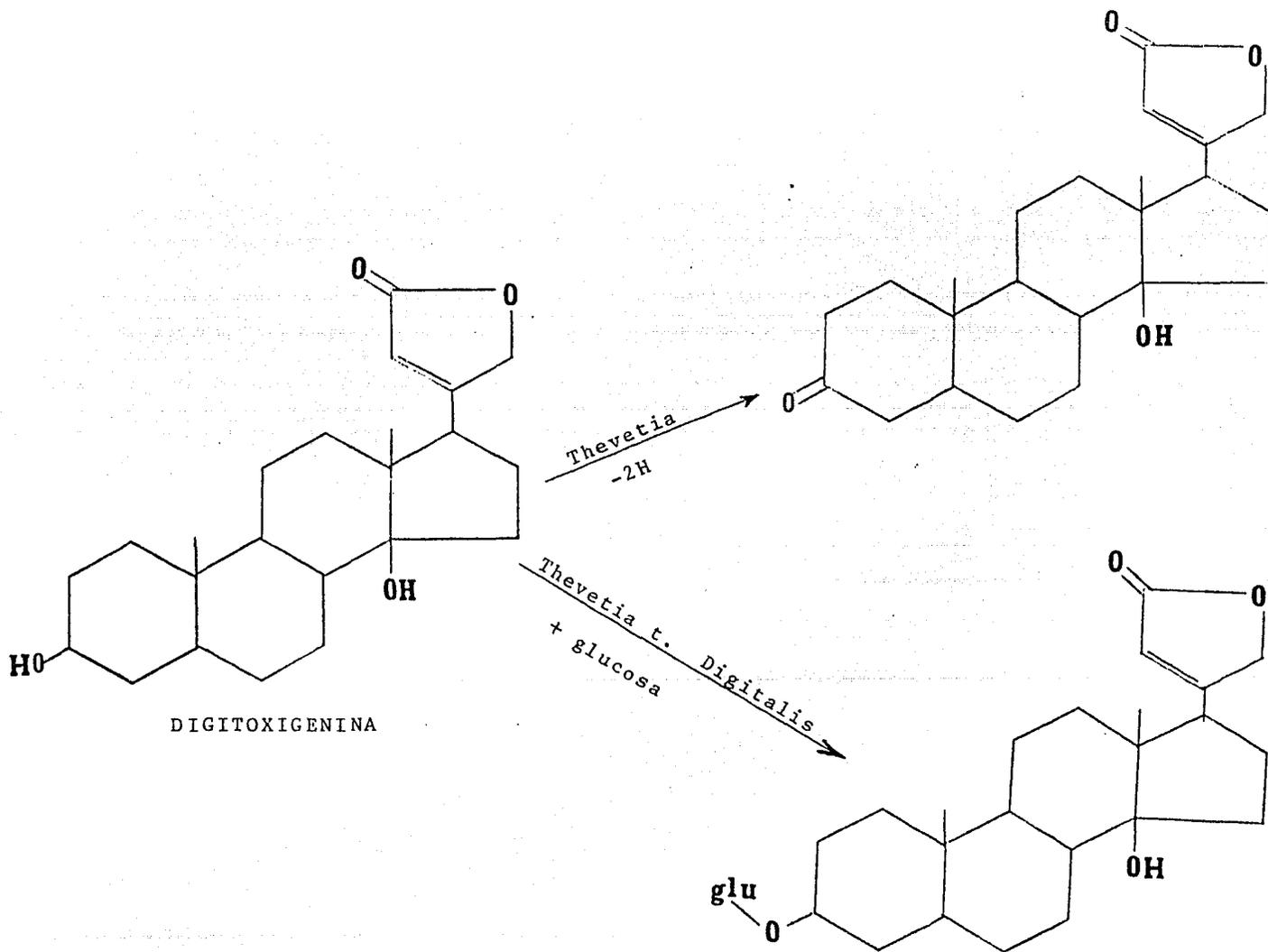


Fig 8. Biotransformación de digitoxigenina en cultivos de células vegetales.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las plantas superiores son la fuente más rica de fármacos y de la mayoría de las materias primas necesarias para su síntesis. No obstante, la vegetación en todo el mundo disminuye a una velocidad alarmante debido a la explotación incontrolada, destrucción del habitat natural y de las dificultades para su cultivo.

Como una alternativa para estos problemas surge la nueva técnica; "Cultivo de Células Vegetales" la cual se considera apropiada y con grandes perspectivas para la producción de fármacos, materias primas y biotransformaciones realizadas sobre sustancias adicionadas al medio de cultivo.

De los factores que determinan la evolución de un cultivo de células vegetales se destacan el explante y el medio de cultivo. El mejor explante para este tipo de cultivos lo constituyen las semillas o raíces de la planta(23,26).

Para establecer el medio de cultivo para células vegetales es necesario que se maneje cuidadosamente cada uno de los constituyentes ya que cada uno presenta una influencia significativa sobre los resultados del cultivo.

El cultivo de células vegetales generalmente se inicia con la inducción y mantenimiento de un callo. Cuando el callo se logra mantener viable durante más de tres resiembras, se puede pasar a cultivos en suspensión pasando las células callosas a un medio de cultivo líquido. Finalmente cuando las células se desarrollan en el medio líquido se pueden iniciar estudios de biosíntesis y biotransformación(23,26).

Para la inducción de los callos se debe considerar muy en serio la relación hormonal auxina/citocinina, debido a que de ello

depende en mucho el éxito del cultivo celular.

Los cardiotónicos son fármacos utilizados terapéuticamente - contra la insuficiencia cardíaca, enfermedad que en México ocupa uno de los primeros lugares en morbilidad y mortalidad, según reportes del Instituto Nacional de Cardiología(65). Estos fármacos se extraen comunmente de plantas del género de Digitalis, debido a que su síntesis química es muy costosa. Los estudios realizados recientemente en México(7,8,9), han demostrado que la planta del género Thevetia contiene cantidades significativas de cardiotónicos.

Por lo anteriormente mencionado y debido a que la Thevetia es una planta que se encuentra ampliamente distribuída en el país, - se decidió utilizarla en este estudio para el desarrollo de callos de tejido mediante el cultivo de partes de cotiledón de esta planta, ya que su semilla es el órgano que contiene mayor cantidad de cardiotónicos.

3. OBJETIVOS

Establecer un cultivo de callos de células vegetales a partir de cotiledones de semillas de Thevetia thevetioides.

Evaluar el efecto de la relación hormonal Auxina/Citocinina sobre el cultivo de callos para encontrar las condiciones adecuadas de estas hormonas en la inducción y mantenimiento de los callos de T. thevetioides.

Evaluar el efecto de la luz sobre la inducción y desarrollo de los callos de células de T. thevetioides y su interacción con la relación hormonal Auxina/Citocinina.

Evaluar la presencia o ausencia de cardiotónicos en los cultivos de callos de T. thevetioides de ocho semanas de edad crecidos en las diferentes condiciones de luz y concentraciones hormonales.

4. HIPOTESIS

Bajo condiciones adecuadas de luz y balance hormonal auxina/citocinina y otras condiciones estandar, se obtendrá un callo de células de Thevetia thevetioides, por medio del cultivo de células IN VITRO, útil para la biosíntesis de cardiotónicos.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. MATERIAL

5.1.1 EQUIPO

Autoclave
Campana de flujo laminar (Vec)
Aparato destilador de agua
Refrigerador
Balanza
Gabinete de control de temperatura
Lamparas fluorescentes (Curvalum de 40 W).
Rotavapor
Cámara de Neubauer
Estufa
Bomba de vacío
Centrífuga (Sol-Bat)
Espectrofotómetro (Beckman)
Agitador mecánico de propela
Agitador magnético (Magnestir)
Agitador magnético para tubos de ensayo (Vortex)
Microscopio
Extracor Soxhlet
Equipo de destilación (Corning)

5.1.2 MATERIAL DE VIDRIO

Frascos de cultivo Gerber
Matraces Erlenmeyer
Pipetas de varias medidas
Pipetas pasteur
Vasos de precipitados
Varillas de vidrio
Portaobjetos
Cubreobjetos
Probetas
Cajas de petri
Tubos de ensayo con rosca, -
de 50 ml.
Tubos de ensayo de 15, 20 y
25 ml.

5.2 METODOLOGIA

5.2.1 RECOLECCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico a utilizar son semillas del árbol de Thevetia thevetoides que se localiza en Izucar de Matamoros, estado de Puebla, como a 12 km de la carretera Izucar de Matamoros--Oaxaca.

Las semillas se encuentran en el interior de una vaina en forma de nuez localizada en el interior del fruto que produce el árbol. La vaina extrída del fruto se pone a secar en una estufa a 40°C por 2-3 días para su conservación.

5.2.2 DESINFESTACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

- 1.- Abrir la vaina y extraer la semilla cuidando de no dañar el tejido.
- 2.- Colocar las semillas en agua destilada suficiente para cubrir las y reposarlas por 30 minutos.
- 3.- Lavar las semillas varias veces con agua destilada y quitarles la membrana exterior que las cubren cuidando de no dañar el tejido.
- 4.- Colocar las semillas en etanol al 70% por 2-3 minutos.
- 5.- En la campana de flujo laminar, lavar las semillas con agua destilada estéril 4-5 veces y drenar el recipiente.
- 6.- Poner las semillas sobre una solución de hipoclorito de sodio al 5% por 20 minutos.
- 7.- Lavar las semillas con agua destilada estéril 4-5 veces para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio de la superficie.
- 8.- Tomar cada semilla con unas pinzas de disección y enjuagarlas con agua destilada estéril.
- 9.- Poner las semillas lavadas sobre agua destilada estéril en una nueva caja de petri y guardarlas en condiciones estériles

Hasta el momento de la siembra.

5.2.3 PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

Se usa el medio de cultivo basal de Murashige y Skoog(MS).

1.- Preparar las siguientes soluciones.

SOLUCION	COMPONENTE	CONCENTRACION(g/l)
A	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44
B	NH_4NO_3	165
	KNO_3	190
C	KI	0.083
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025
D	KH_2PO_4	17
	H_3BO_3	0.62
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
E	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.23
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.86
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025
F	Na_2EDTA	3.723
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.795
G	Glicina	0.2
	Acido nicotínico	0.025
	Mio-inositol	0.100
H	Clorhidrato de piridoxina	0.050
	Clorhidrato de tiamina	0.010

Pesar los componentes de las soluciones A a la H excepto los de la F y colocarlos en vasos de precipitados, disolverlos con una poca de agua destilada y desionizada. Pasar las soluciones a matraces volumétricos de un litro y llevarlos al aforo con la misma agua.

Pesar los constituyentes de la solución F y disolverlos en recipientes separados, calentar suavemente la solución de --- EDTA- Na_2 y agregarla gota a gota a la de sulfato ferroso. Dejar enfriar la mezcla y llevarla a un litro con un matraz aforado y usando agua destilada y desionizada.

Soluciones de las hormonas

Auxina: Pesar 10 mg de ácido indolacético (IAA) y disolverlo en una mezcla de etanol-agua al 30% de etanol v/v. Pasar la solución a un matraz aforado de 50 ml y llevar al volúmen con la misma mezcla. La concentración final de esta solución es de 200 mg de IAA por litro de solución.

Citocininas: Pesar 10 mg de cinetina (C) y disolverlos en una pequeña cantidad de ácido clorhídrico 0.5N con un ligero calentamiento. Dejar enfriar la solución y pasarla a un matraz aforado de 50 ml. Llevar al aforo con agua destilada y desionizada. La concentración final de esta solución es de 200 mg de cinetina por litro de solución.

Guardar las soluciones en refrigeración a excepción de la B y la E quienes precipitan a bajas temperaturas.

Las soluciones hormonales se preparan cada 15 días debido a que estas se descomponen cuando se almacenan por mucho tiempo.

Las soluciones G y H, de las vitaminas, se preparan cada 20 días porque este tipo de substancias duran poco tiempo en solución.

2.- Poner 400 ml de agua destilada y desionizada en un matraz erlenmeyer de 2 litro.

3.- Adicionar 10 ml de las soluciones A hasta la H al matraz anterior.

Adicionar el volúmen de las soluciones hormonales necesario para obtener la concentración requerida según el número de tratamiento a realizar de acuerdo a la matriz experimental (tabla 3, pag. 51).

5.- Agregar 30 g de sacarosa.

6.- Diluir con agua destilada y desionizada hasta 800 ml.

7.- Ajustar el pH a 5.8 con una solución de hidróxido de sodio o ácido clorhídrico 0.1N según sea el caso.

8.- Adicionar 9 g de agar y completar el volumen de la solución a un litro con la misma agua.

9.- Disolver el agar por calentamiento con ayuda de un mechero.

10.- Mezclar perfectamente el medio y depositar 25 ml del mismo en frascos de cultivo de 125 ml, tapar los frascos con papel aluminio fijándolo con una liga.

12.- Esterilizar los frascos con el medio de cultivo en una autoclave a 121°C (15 lb de presión) por 15 minutos.

13.- Dejar solidificar el medio en los frascos y refrigerarlos hasta el momento de su uso.

5.2.4 OBTENCION DEL EXPLANTE

1.- En condiciones estériles, tomar el tejido desinfectado y aislar de las semillas los cotiledones separándolos con ayuda de unas pinzas de disección.

2.- Poner los cotiledones aislados en una caja de petri -

estéril y separar de los cotiledones la yema quienes se colocan en otra caja de petri destinada a contener solo yemas.

3.- Los cotiledones sin yemas se fijan a la pared inferior de la caja de petri.

4.- Tomar una fracción de cotiledón con ayuda del aparato cortador (pag. 62) tratando de obtener explantes de partes simétricas del cotiledón.

5.- Colocar los explantes obtenidos con el muestreador en agua destilada estéril contenida en otra caja de petri y eliminar los fragmentos de tejido ajenos al explante.

6.- Drenar las cajas que contienen los explantes y las yemas, verter sobre ambos tipos de explantes, las yemas y los obtenidos con el muestreador, hipoclorito de sodio al 5% y reposar - por 15 minutos.

7.- Pasado el tiempo lavar los explantes varias veces con agua destilada estéril para eliminar el hipoclorito de sodio.

8.- Pasar los explantes a nuevas cajas de petri estériles que contengan papel filtro (también estéril) en el fondo para absorber el exceso de agua.

9.- Los explantes obtenidos de esta manera quedan desinfectados y listos para ser sembrados.

5.2.5 SIEMBRA

En condiciones estériles, usando una campana de flujo laminar, se procede a sembrar de la siguiente manera.

1.- Tomar un frasco de cultivo con medio y destaparlo con ayuda de unas pinzas de disección previamente flameadas.

2.- Tomar el explante con otras pinzas de disección flameadas y colocarlo en el centro del medio de cultivo.

3.- Tapar el frasco de cultivo con las otras pinzas de disección asegurándose de que quede bien cerrado.

4.- Proceder de la misma forma con todos los frascos de cultivo y meterlos a incubar a 28°C.

5.2.6 DETERMINACION DEL PESO FRESCO

1.- Tomar el frasco con el tejido cultivado y extraer el callo con unas pinzas de disección colocándolo en una balanza analítica.

2.- Determinar el índice de peso fresco mediante la siguiente fórmula:

$$I.P.F. = \frac{P.F.F. - P.F.I.}{P.F.I.}$$

Donde;

I.P.F. = Índice de peso fresco.

P.F.F. = Peso fresco final del tejido después de la incubación durante un tiempo t.

P.F.I. = Peso inicial del explante ántes de incubar

5.2.7 DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS

1.- Tomar el callo utilizado para la determinación del peso fresco y colocarlo en un tubo de ensayo de 50 ml con tapón de baquelita.

2.- Adicionar al tubo 25 ml de agua destilada y una barra magnética de 0.5 cm.

3.- Disgregar el tejido mediante agitación durante 10 minutos, cuidando de usar siempre la misma velocidad de agitación.

4.- Determinar la absorbancia de la suspensión celular obtenido a 454 nm.

5.- Determinar el número de células disgregadas del callo extrapolando la lectura obtenida en la curva estándar (pag. 65).

5.2.8 DETERMINACION DEL PESO SECO

- 1.- Tomar el callo y colocarlo en un tubo de ensayo tarado de 20 ml.
- 2.- Colocar el tubo con el callo en una estufa a 65°C durante 24 hrs.
- 3.- Pesar el tubo con el callo seco y determinar el peso seco del callo por diferencia.

5.2.9 DETERMINACION DE LA FRIABILIDAD CELULAR DEL CALLO

- 1.- Tomar el callo y pesarlo en una balanza analítica.
- 2.- Colocar el callo en un tubo de ensayo de 50 ml con tapa de baquelita.
- 3.- Adicionar 50 ml de agua destilada y una barrita magnética de 0.5 cm.
- 4.- Agitar por 15 minutos mediante un agitador magnético-procurando usar siempre la misma velocidad.
- 5.- Tomar el núcleo del callo con unas pinzas de disección y eliminar el exceso de agua de su superficie con ayuda de papel filtro.
- 6.- Reposar el núcleo húmedo durante 15 minutos a 25°C para orearlo.
- 7.- Pesar el núcleo oreado en la misma balanza usada para el paso uno y calcular el porcentaje de friabilidad mediante la siguiente fórmula:

$$F = \frac{P.N.}{P.F.I.} \times 100$$

Donde;

- P.F.I. = Peso frsco inicial del callo
P.N. = Peso del núcleo obtenido
F = Friabilidad en porcentaje

5.2.10 EVALUACION DE LA PRESENCIA DE TEVETOSIDOS TOTALES

1.- Colocar los callos en una mezcla de cloroformo:metanol 1:1 (25 ml), usando un tubo de ensayo de 50 ml con tapón de baquelita.

2.- Adicionar una barra magnética de 0.5 cm y agitar por 2 horas mediante un agitador magnético.

3.- Filtrar la mezcla usando un embudo de tallo corto y algodón como medio filtrante.

4.- Cromatografiar la solución filtrada usando placas de 10x25 cm preparadas con Sílica Gel HF-254 y activadas mediante exposición en una estufa a 150°C. Usar como eluyente cualquiera de los dos sistemas siguientes:

Sistema I : Cloroformo:metanol 9:1

Sistema II: Cloroformo:metanol 1:1

Usar como muestra de referencia una mezcla de tevetósidos o nerifolina.

5.- Revelar las placas con luz ultravioleta o con yodo.

5.2.11 EVALUACION DEL CONTENIDO DE TEVETOSIDOS TOTALES

1.- Preparar las siguientes soluciones:

a) Solución madre de nerifolina o tevetósidos

Desecar al vacío, en un desecador con sílica, una muestra de tevetósidos o de nerifolina por 24 horas.

Pesar 30 mg de la sustancia seca y disolverlos en 100 ml de etanol usando un matraz volumétrico.

b) Solución estandar de tevetósidos o nerifolina

Tomar 40 ml de la solución madre de nerifolina o tevetósidos y diluir a 50 ml en un matraz volumétrico.

c) Reactivo alcalino de picrato

Disolución de hidróxido de sodio al 3% : Pesar 3 g de hidróxido de sodio y disolverlos en 100 ml de agua destilada (solución A).

Disolución de ácido pícrico: Pesar 600 mg de ácido pícrico y ponerlos en un matraz aforado de 100 ml. Agregar 25 ml de agua caliente y disolver. Dejar enfriar y aforar a 100 ml con agua fría. Guardar esta solución en un frasco ambar (B).

Transferir 10 ml de (A) con una pipeta volumétrica a un matraz aforado de 100 ml y agregarle exactamente 20 ml de (B). Mezclar y aforar al volúmen con agua destilada. (Preparar antes de su uso).

2.- Pesar tres callos y ponerlos en un tubo de ensayo de 50 ml con tapon de baquelita.

3.- Adicionar al tubo, 45 ml de una mezcla de cloroformo: metanol 1:1.

4.- Adicionar una barra magnética de 0.5 cm y agitar por tres horas a una velocidad constante.

5.- Filtrar usando un embudo de tallo corto y algodón. Enjuagar el tubo y el embudo con 5 ml de la mezcla de solventes y adicionarla al filtrado, el cual se recibe en un matraz aforado de 50 ml.

6.- Llevar el filtrado a 50 ml con la misma mezcla de solventes.

7.- Mezclar y tomar una alícuota de 5 ml la cual se coloca en los tubos de ensayo de 20 ml.

8.- Evaporar el solvente de la alícuota por calentamiento en un baño de vapor suave.

9.- Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente y agregarles 5 ml de metanol para redissolver y luego 5 ml de reactivo alcalino de picrato.

10.- Mezclar y dejar reposar por 30 minutos.

11.- Determinar la absorbancia de estas soluciones a 492 nm, usando como blanco una solución de 5 ml de etanol tratado con todos los reactivos y de la misma manera que las muestras.

12.- Calcular la concentración de las muestras por extrapolación en una curva estándar preparada de la siguiente manera:

Tubo	1	2	3	4	5	6
Nerifolina o tevetósidos (mg/100 ml)	1.2	2.4	3.6	4.5	6.0	0.0
Solución estándar de nerifolina o tevetósidos	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	-
Etanol	4.0	3.0	2.0	1.0	-	5.0

A cada tubo se le agregan 5 ml de reactivo alcalino de picrato, se mezclan y reposan 30 minutos y se les determina su absorbancia igual que a las muestras. El tubo 6 se usa como blanco para la determinación.

5.2.12 EVALUACION DEL PORCIENTO DE CONTAMINACION Y DIFERENCIACION.

Determinar el porciento de contaminación mediante la observación de presencia o ausencia de colonias microbianas en los cultivos. Reportar el porciento de contaminación en referencia al número de cultivos contaminados con respecto al total sembrado.

Determinar el porciento de diferenciación de manera similar la de contaminación pero en este caso observando la presencia o ausencia de cualquier tipo de tejido diferenciado (brotes, raíces

hojas) en cultivos de diferentes edades. El porcentaje de diferen
ciación se reporta con respecto al número total de vasos de cultivi
vo sembrados.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MODELO ESTADÍSTICO

6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

La inducción de callos por medio de cultivo de células vegetales requiere de una fuente vegetal seleccionada y clasificada botánicamente para evitar variaciones en los resultados, debidas a las diferentes especies existentes en la naturaleza e inclusive en el mismo lugar. En este estudio se usa el árbol Thevetia thevetioides, que se localiza en Izúcar de Matamoros, Oaxaca (pag.5)

Seleccionada la fuente vegetal, se procede a realizar el trabajo de acuerdo al esquema II

La evaluación del tamaño del explante así como el estudio del tiempo de exposición y concentración del agente desinfectante, que garantice la eliminación de la contaminación microbiana se realiza en una etapa primera del trabajo, encontrándose la necesidad de buscar un método idóneo para obtener explantes de tamaño y formas adecuados.

Determinadas las condiciones de desinfección y tamaño de explante se procede a evaluar el efecto de la luz y balance hormonal auxina/citocinina, para lo cual se utiliza un diseño experimental de tipo factorial que implica dos niveles de luz, cinco de citocinina (cinetina C) y cuatro de auxina (ácido indol-acético IAA), (tabla III).

Los tratamientos enumerados en la tabla del diseño factorial se toman al azar quedando como muestra la tabla IV, que es el orden experimental que se sigue para realizar los tratamientos.

En la tabla V se indica la relación hormonal IAA/C que corresponde a cada tratamiento según el diseño factorial y que corresponden a cada tratamiento de acuerdo a las concentraciones -

ESQUEMA II

DIAGRAMA DE FLUJO DE TRABAJO

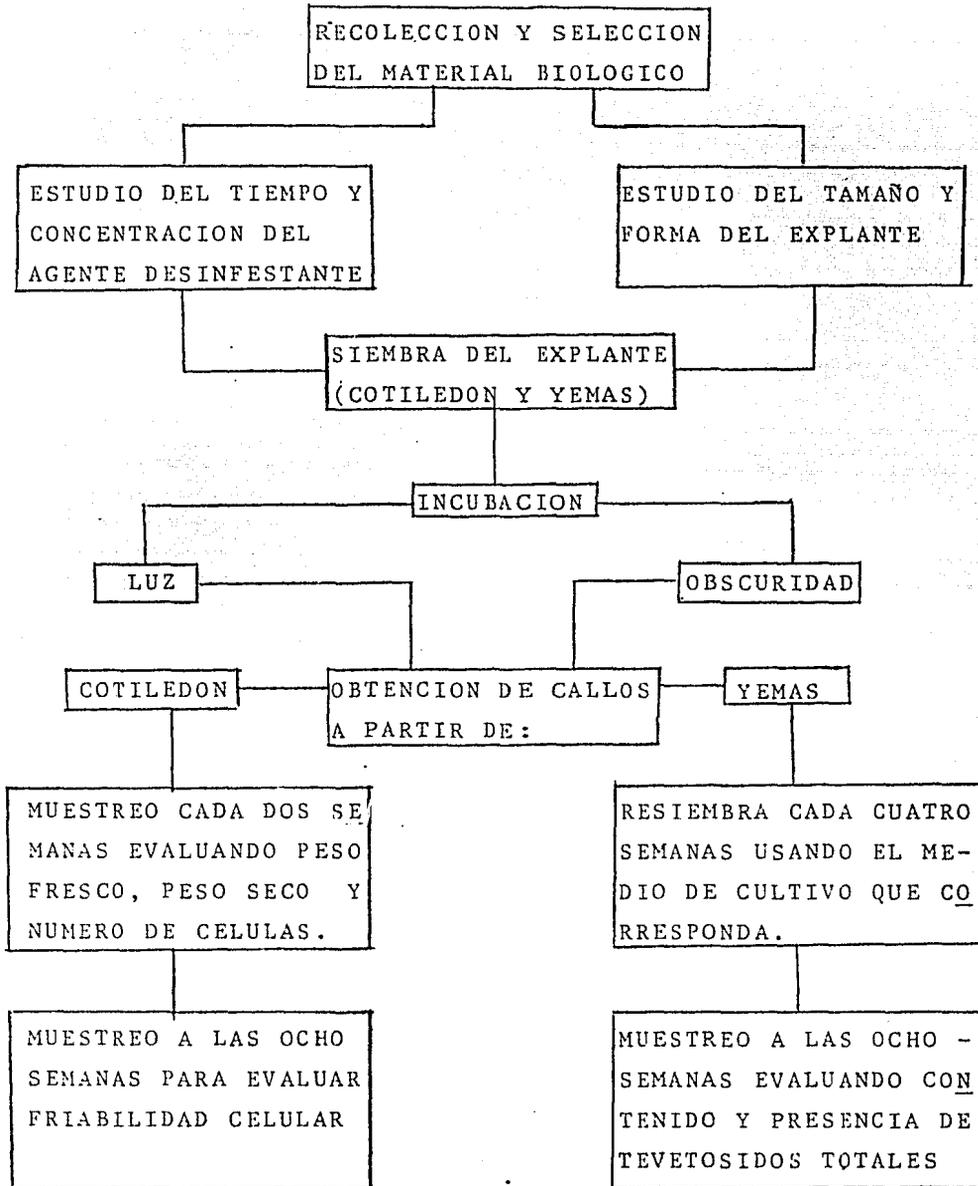


TABLA III

MATRIZ EXPERIMENTAL Y NUMERO DE TRATAMIENTO

	Cinetina (ppm)	Acido indolacético (ppm)			
		0.01	0.10	1.00	2.50
L U Z	0.00	1	2	3	4
	0.05	5	6	7	8
	0.25	9	10	11	12
	1.00	13	14	15	16
	1.50	17	18	19	20
O B S C U R I D A D	0.00	1	2	3	4
	0.05	5	6	7	8
	0.25	9	10	11	12
	1.00	13	14	15	16
	1.50	17	18	19	20

Cada número en las celdas representa un tratamiento. Los 20 tratamientos se desordenan posteriormente para obtener un diseño factorial completamente al azar. ppm., concentración en partes por millón.

TABLA IV
 NUMERO DE TRATAMIENTOS Y ORDEN EXPERIMENTAL

Cinetina (ppm)	Acido indolacético (ppm)			
	0.01	0.10	1.00	2.50
0.00	1	2	3	4
	4	16	2	9
0.05	5	6	7	8
	7	12	5	18
0.25	9	10	11	12
	11	15	6	3
1.00	13	14	15	16
	10	13	8	1
1.50	17	18	19	20
	17	14	20	19

Los números superiores de cada celda se refieren al número de tratamiento, los inferiores indican el orden en que se ejecuta cada tratamiento. El orden experimental, obtenido al azar, es el mismo para luz y obscuridad.

TABLA V

MATRIZ EXPERIMENTAL Y RELACION HORMONAL IAA/C

Cinetina (ppm)	Acido indolacético (ppm)			
	0.01	0.10	1.00	2.50
0.00	--	--	--	--
0.05	0.200	2.000	20.000	50.000
0.25	0.040	0.400	4.000	10.000
1.00	0.010	0.100	1.000	2.500
1.50	0.006	0.066	0.666	1.600

IAA, ácido indolacético; C cinetina; ppm - partes por millón. La relación hormonal se de termina dividiendo la concentración de IAA en tre la de C.

hormonales, quienes se eligen de acuerdo a lo que indica la literatura como más adecuado para la producción de callos de tejidos de Thevetia: 1 ppm de IAA y 1 ppm de C(56).

Para la evaluación de los factores antes mencionados se utilizan como variables de respuesta los siguientes parámetro: peso fresco, peso seco y número de células. Estas tres variables son indicadores del crecimiento del tejido calloso a través del tiempo.

Otros factores importantes a evaluar son la presencia o ausencia de cardiotónicos y friabilidad celular. Esta última con el fin de poder predecir si los callos obtenidos son adecuados para iniciar un cultivo en suspensión, lo cual requiere de una fácil disgregación del tejido calloso. Estas dos últimas variables se determinan a las ocho semanas de cultivo para darle tiempo al tejido de crecer lo más posible y producir una buena cantidad de cardiotónicos.

Para la evaluación de las variables de respuesta mencionadas, en cada tratamiento se preparan 65 vasos de cultivo de 125 ml con 25 ml de medio cada uno. De estos, 52 se usan para sembrar explantes cilíndricos y 13 para yemas. Los vasos sembrados se dividen de acuerdo al diagrama de árbol que se muestra en el esquema III.

6.2. MODELO ESTADISTICO

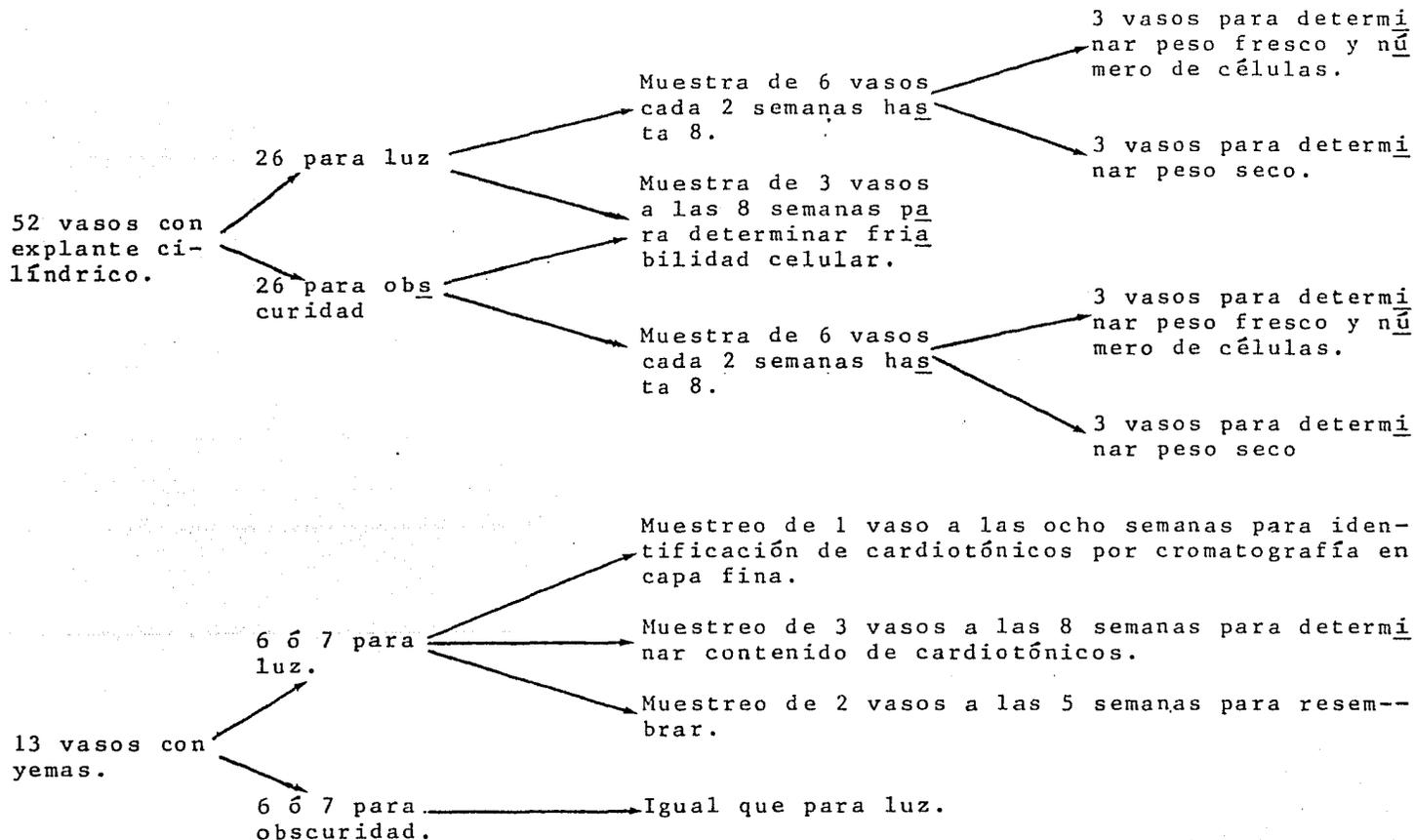
Para el análisis de los datos se utiliza el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + C_j + L_k + AC_{ij} + AL_{ik} + CL_{jk} + ACL_{ijk} + E_l(ijk)$$

Donde;

Y = Variable de respuesta a un tiempo t (peso fresco,

ESQUEMA III
DIAGRAMA DE ARBOL DE LA DISTRIBUCION DE LOS VASOS DE
CULTIVO



peso seco, número de células, friabilidad celular ó contenido de cardiotónicos).

\bar{A} = Media total o gran media.

A = Factor auxina (ácido indolacético IAA).

C = Factor citocinina (cinetina C).

L = Factor luz o fotocondiciones (luz y oscuridad)

E = Error experimental.

i = Niveles de auxina (i = 1, ..., 4)

j = Niveles de citocinina (j = 1, ..., 5)

k = Niveles de luz (k = 1, 2)

l = Número de repeticiones (l = 1, 2, 3).

Para evaluar el efecto que ejercen dichos factores y sus interacciones entre sí sobre las variables de respuesta se usa un análisis de varianza de tres factores.

Cabe mencionar que se buscó un modelo matemático por correlación múltiple lineal al cual se ajustaran los datos obtenidos con el fin de poder predecir el comportamiento del cultivo con respecto a variaciones presentes en las variables de respuesta. No obstante, el haber demasiadas variables que influyen en dicho comportamiento no permitió encontrar el modelo adecuado.

7. RESULTADOS

Con el fin de facilitar la interpretación y comprensión de los resultados, estos se presentan en el orden de experimentación seguido para el desarrollo del trabajo ya que los primeros son base de los siguientes.

Para la evaluación de la luz y balance hormonal nos encontramos con dos tipos de tratamientos; los que no involucran a la cinetina y los que sí la involucran. Por esta razón los resultados de esa parte experimental se dividen en dos secciones.

Las variables de respuesta se presentan por separado para poder evaluar mejor la información que nos proporcionan. Al final de la sección de resultados se da un resumen de los mismos comparando las variables de respuesta entre sí para llegar a algo más concreto en fundamentos discutidos al inicio del trabajo.

A continuación presentamos los resultados, dando un breve análisis de los mismos.

7.1 DETERMINACION DEL TIEMPO DE DESINFESTACION Y CONCENTRACION DEL AGENTE DESINFESTANTE.

Se desinfestaron varias semillas de T.thevetioides, con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) y se incubaron por tres semanas a 28°C al cabo de las cuales se observa el porcentaje de contaminación (tabla VI).

En la tabla se ve que a bajas concentraciones de NaClO y bajo tiempo de exposición del tejido ante el mismo, el porcentaje de contaminación es muy elevado, mientras que al aumentar ambos factores, esta disminuye.

No obstante lo anterior, no se puede aumentar el tiempo de desinfestación ni la concentración de hipoclorito de sodio indefinidamente ya que el tejido vegetal también puede llegar a destruí

do. Así, al medir la viabilidad del tejido por medio de la presencia de brotes, raíces, tejido calloso, pigmentos u hojas, se observó que a una concentración de hipoclorito de sodio al 5% y a un tiempo de desinfestación de 15 minutos el porcentaje de contaminación es sólo del 5%, conservándose la viabilidad celular, en cambio cuando el tiempo de desinfestación es de 20 minutos la viabilidad celular se ve fuertemente disminuída (estimada entre el 85 y el 90%).

De esta manera, la concentración de hipoclorito de sodio más adecuada para la desinfestación del tejido es del 5% con un tiempo de desinfestación de 15-20 minutos (arriba de 15 pero abajo de 20). Estas son las condiciones que se utilizan para la desinfestación del tejido durante el desarrollo experimental.

TABLA VI
PORCIENTO DE CONTAMINACION CON RESPECTO A LA CONCENTRACION DE HIPOCLORITO DE SODIO (NaClO) Y EL TIEMPO DE DESINFESTACION

NaClO (%)	Tiempo de desinfestación (min)			
	5	10	15	20
0.5	100	100	100	100
2.5	100	100	90	60
5.0	50	30	5	0

Los cultivos se incuban en obscuridad total por tres semanas. El tiempo de desinfestación se refiere al tiempo de exposición del tejido ante el hipoclorito de sodio.

7.2 SELECCION DEL TAMAÑO DEL EXPLANTE MAS ADECUADO PARA LA INDUCION DE CALLOS A PARTIR DE DIFERENTES PARTES DE LA SEMILLA - DE T. thevetioides.

Se toman varias semillas, se desinfestan y en condiciones estériles se dividen en fracciones de diferentes tamaños, quienes se siembran en el medio basal de MS con 2.5 ppm de IAA y 1 ppm de C. Los vasos de cultivo se incuban a 28°C por cuatro semanas al cabo de las cuales se evalúa la presencia de contaminación, producción de callos, diferenciación y pigmentación (tabla VII).

Los resultados indican que no hay contaminación y que la presencia de callos es más frecuente al disminuir el tamaño del explante, comenzando a manifestarse con 1/4 de cotiledón y más claramente con 1/8.

Cuando el tamaño del explante es de 1/16 de cotiledón, la viabilidad del tejido se pierde (no reportado), es decir, no hay contaminación pero tampoco ninguna señal de que el explante pueda diferenciarse o producir tejido calloso.

Todas las yemas producen callo y no se diferencian. En contraste con la presencia de callos, la diferenciación y pigmentación son muy frecuentes en los explantes de mayor tamaño tales como las semillas completas, medias semillas, cotiledón, medio y un cuarto de cotiledón. Aunque la diferenciación se debe tal vez a que dichos explantes contienen muchas más células periféricas o del centro de la semilla, quienes no están preparadas para presentar este fenómeno, de acuerdo a la posición que ocupaban en la semilla originalmente.

De la misma tabla se observa que la diferenciación y pigmentación en los explantes desaparece o son menos frecuentes con el tamaño de 1/8 de cotiledón y la presencia de callos con

TABLA VII
 PRESENCIA(+) O AUSENCIA(-) DE CONTAMINACION, TEJIDO
 CALLOSO, DIFERENCIACION Y PIGMENTACION EN LOS
 CULTIVOS DE T.thevetoides CON VARIOS
 TIPOS DE EXPLANTES

EXPLANTE	CONTAMINACION	CALLO	DIFERENCIACION	PIGMENTACION
S	-	-	R, T, H	+
1/2Sh c/y	-	-	R	+
1/2Sh s/y	-	-	R	+
C c/y	-	-	R	+
C s/y	-	-	R	+
1/Cv	-	-	R	+
1/2 Ch	-	-	R	+
1/4C	-	+, -	R	+
1/4C	-	+, -	R	+
1/4C	-	+, -	-	+
1/8C	-	+	-	-
1/8C	-	+	R	-
1/8C	-	+	-	-
1/8C	-	+	-	-
1/8C	-	-	R	-
1/8C	-	-	-	-
Y	-	+	-	-
Y	-	+	-	-

S semilla completa, C cotiledón; h corte horizontal, v vertical
 c. con; y yema, Y yema; s sin; R raíz; T tallo; H hoja.

este tamaño de explante también es mayor.

Por lo anterior se decidió idear un método que permitiera obtener explantes aproximadamente de ese tamaño y con una mayor superficie de corte para la producción de células callosas.

De esta manera se diseñó un aparato muestreador que permite obtener explantes de tamaño y forma regular a partir de los cotiledones de la semilla (fig 9). Este aparato permite también obtener explantes simétricos con respecto a la posición del tejido en el cotiledón, evitando de esta forma incluir en el cultivo partes periféricas y centrales de la semilla, disminuyendo la posibilidad de que ocurra diferenciación (fig. 9-B).

El espesor de los explantes obtenidos con dicho aparato depende del espesor de cada cotiledón, que varía de semilla a semilla. En la figura 12B se observa la forma cilíndrica del explante lo cual permite mantener la superficie de corte, que es donde se desarrollan las células callosas, dentro de un intervalo muy estrecho independientemente del tamaño de la semilla y dependiendo solamente del espesor de los cotiledones.

En la tabla VIII se presentan las observaciones realizadas con el aparato muestreador e indican que todos los explantes obtenidos con este aparato forman callos, mínima diferenciación y pigmentación. Los resultados obtenidos con los otros tipos de explantes son similares a los presentados en la tabla VII.

De esta manera se decidió usar el aparato muestreador para obtener los explantes a utilizar en el desarrollo de este trabajo.

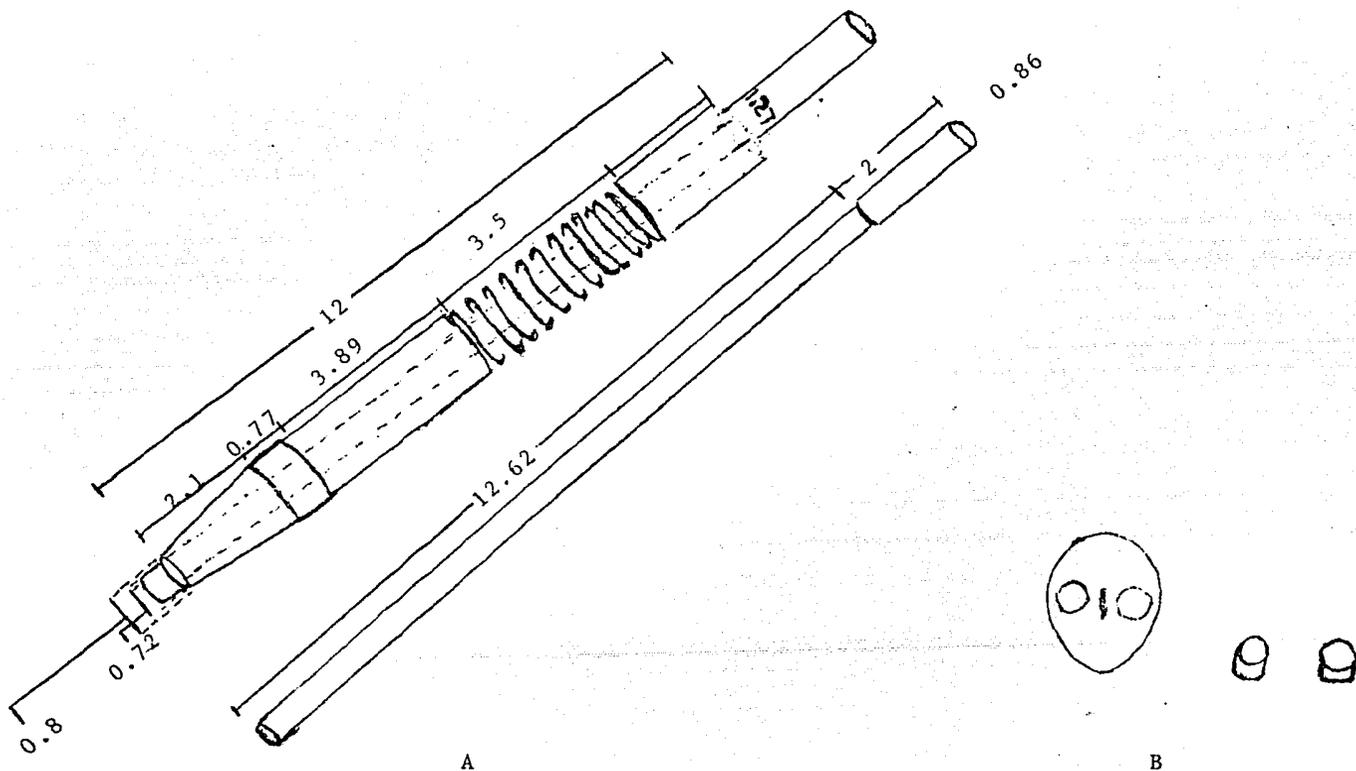


Fig. 9. (A) aparato utilizado para muestrear explantes a partir de cotiledones de semillas de *T. tevetoides* (B).

TABLA VIII

PRESENCIA(+) O AUSENCIA(-) DE CONTAMINACION, TEJIDO CALLOSO
 DIFERENCIACION Y PIGMENTACION EN CULTIVOS DE THEVETIA
thevetioides USANDO DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTES

EXPLANTE	CONTAMINACION	CALLO	DIFERENCIACION	PIGMENTACION
S	+	-	-	-
C	-	-	R	+
C c/y	-	-	R, T, H	+
1/2C c/o	-	-	-	+
1/2C	-	-	R	+
1/2C	-	-	-	+
1/4C c/o	-	-	-	+
A.M.	-	+	-	-
A.M.	-	+	R	-
A.M.	-	+	-	-
A.M.	-	+	-	-
A.M.	-	+	-	-
A.M.	-	+	-	-
Y	-	+	-	-
Y	-	+	-	-

S, semilla completa; C cotiledón; A.M. aparato muestreador c/y con yema; s/y sin yema; c/o con el orificio dejado por el aparato muestreador sobre el cotiledón; Y yema; R raíz; T tallo; H hoja.

7.3 DETERMINACION DE LA LINEARIDAD ENTRE EL NUMERO DE CELULAS DE TEJIDO CALLOSO CONTENIDO EN UNA SUSPENSION Y SU ABSORBANCIA A 254 nm.

Se preparan varias suspensiones con un número conocido de células callosas, quienes se cuentan mediante una cámara de Neubauer y se les determina su absorbancia a 454 nm, que es la longitud de onda máxima encontrada mediante un barrido de la misma suspensión. Las observaciones se presentan gráficamente en la figura 10. El coeficiente de regresión de los datos es de 0.9774.

Lo anterior demuestra que hay un comportamiento lineal apropiado entre la absorbancia y el número de células. Sin embargo, en el transcurso de la experimentación se observó que el tamaño y forma celulares varían considerablemente con el transcurso del tiempo (fig. 11) produciendo un efecto impredecible sobre la absorbancia y por tanto un comportamiento desordenado de los datos - obtenidos con esta variable de respuesta.

El número de células medido por éste método, no resultó ser una variable de respuesta adecuada para explicar y seguir el desarrollo de cultivos de células vegetales.

No obstante lo anterior, medimos esta variable de respuesta durante el transcurso de la experimentación, pero como se mencionó anteriormente no es capaz de dar alguna información valiosa - aparte de la obtenida con las otras variables de respuesta.

● Estimado
• Experimental.

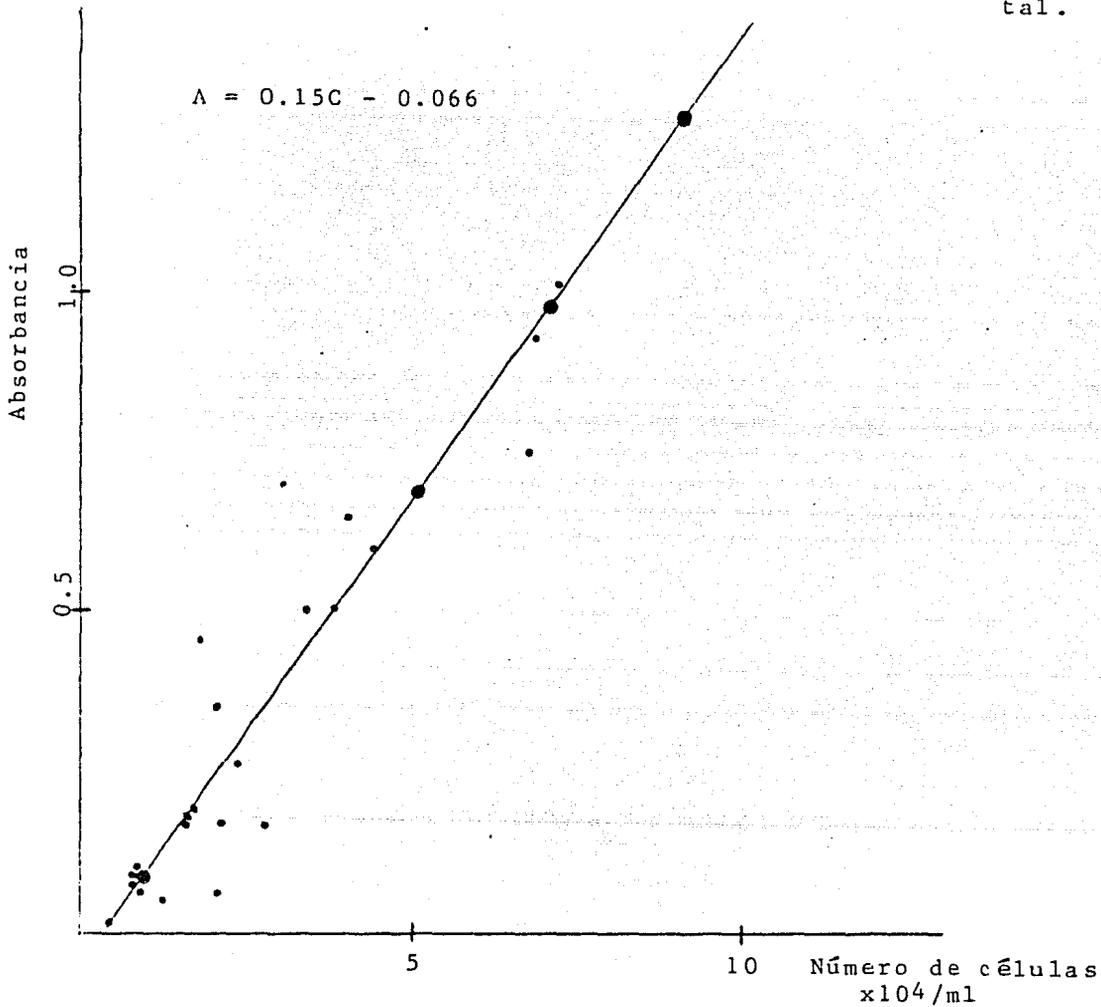
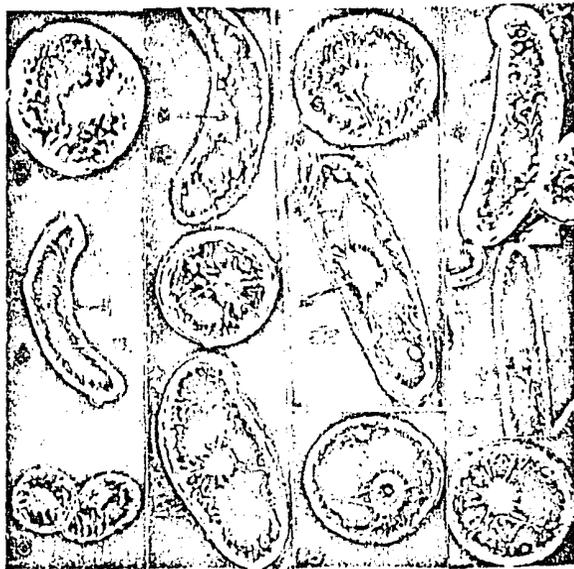
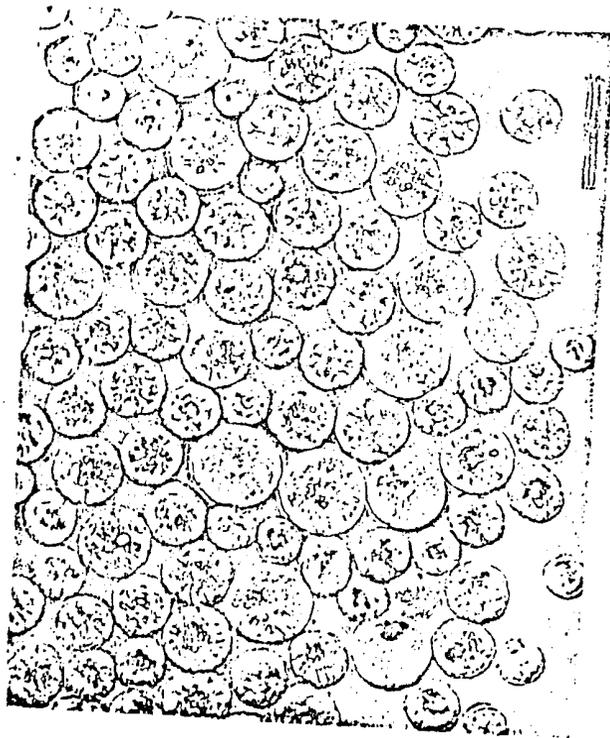


Fig. 10. Absorbancia de células de callos de tejidos de *T. tevetoides* en función del número de células contenidas en suspensión acuosa. Coeficiente de regresión $R = 0.9774$. número de datos = 19. A absorbancia; C número de células x 10⁴ por ml.



(A)



(B)

Fig. 11. Formas celulares presentes en callos de *T. tevetoides* de 6-8 (A) y 4 (B) semanas de edad. (Las fotografías se tomaron de la ref. 33, pero las observaciones son muy similares).

7.4 DETERMINACION DE LA CURVA PATRON DE TEVETOSIDOS TOTALES EN FUNCION DE SU ABSORBANCIA.

Se obtiene la curva patrón de concentración de tevetósidos totales contra absorbancia, que presenta una solución colorida - obtenida de acuerdo a la metodología del punto 5.2.11, y usando como estandar una mezcla de tevetósidos, obtenidos en los laboratorios de orgánica de ENEP-Z a partir de semillas de T.thevetioi des. La curva se presenta en la figura 13.

El coeficiente de regresión de los datos es de 0.9992, e indica que existe una relación lineal entre los datos lo que garantiza la adecuada cuantificación del contenido de cardiotónicos - presentes en los cultivos.

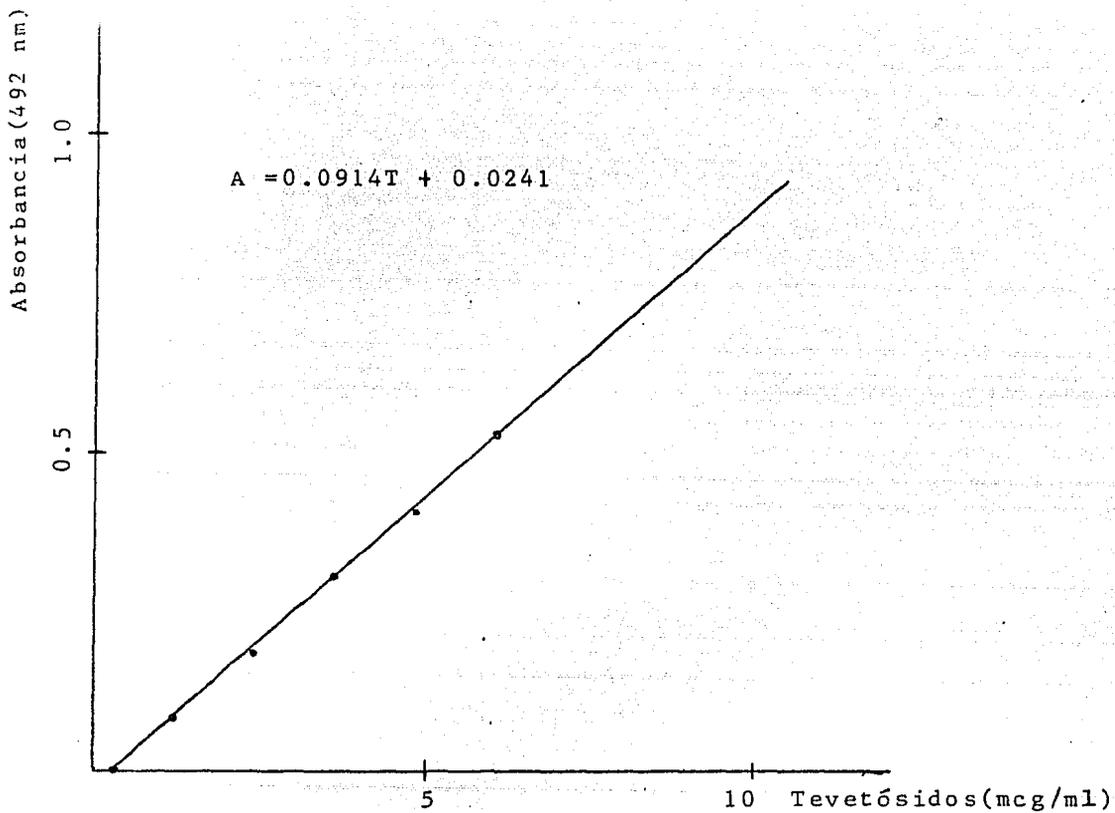


Fig.13 Curva patrón para la cuantificación de tevetósidos totales en función de se absorbancia.

7.5 EVALUACION DEL EFECTO HORMONAL AUXINA (IAA)/CITOCININA (C) Y LA LUZ SOBRE LA INDUCCION Y MANTENIMIENTO DE CALLOS DE T.thevetioides Y SU CONTENIDO DE CARDIOTONICOS.

Seleccionadas las condiciones de desinfección y explantes adecuados, se procede a evaluar el efecto del balance hormonal - IAA/C y luz sobre los cultivos de tejidos de T.thevetioides que nes se obtienen y tratan de acuerdo a la metodología indicada en el punto 5.2.

Las concentraciones hormonales que se usan se indican en la tabla III y después de la aleatorización vemos que el primer tratamiento a realizar es el 16, al cual le corresponden 2.5 ppm de IAA y 1 ppm de C, para el segundo tratamiento a realizar tenemos 1 ppm de IAA y 0 ppm de C y así sucesivamente.

Los primeros cuatro tratamientos que se enmarcan en la matriz experimental no involucran a la hormona C, por lo que en estos casos no existe relación hormonal y por eso se presentan los resultados aparte. De esta manera, primero se dan los resultados que no involucran C, luego a los que involucran ambas hormonas y al final, en un resumen se confrontan los resultados de forma global. A continuación se dan los datos obtenidos con cada variable de respuesta por separado.

7.5.1 TRATAMIENTOS QUE SOLO INVOLUCRAN A LA HORMONA IAA.

1.- Peso fresco

Estos resultados se presentan como índice de peso fresco en la tabla IX.

La tabla indica que el peso fresco aumenta con el tiempo en general para todas las concentraciones de IAA probadas, aunque presenta una variación con respecto a la concentración de IAA y

TABLA IX
 EFECTO DE LA LUZ Y AUXINA (IAA) SOBRE EL INDICE
DE PESO FRESCO DE CALLOS OBTENIDOS A
 DIFERENTES PERIODOS DE
 TIEMPO (T)

	T (sem)	Acido indolacético (ppm)			
		0.01	0.10	<u>1.00</u>	2.50
L U Z	2	0.6937	0.6000	0.9395	1.1538
	4	5.1912	2.9575	5.3159	3.4000
	6	7.6416	2.3866	8.2358	5.1000
	8	7.5000	4.9486	9.3786	6.4542
OBSCURIDAD	2	0.4875	0.2530	0.9736	1.5878
	4	3.2647	1.3695	4.1625	4.2500
	6	3.8716	5.9166	4.3621	4.1000
	8	4.0226	9.9740	5.7383	3.1310

Cada dato es el promedio del índice de peso fresco de tres cultivos. La concentración de IAA subrayada es la que se encontró como más adecuada para esta variable de respuesta. ppm, concentración en partes por millón. IAA, ácido indol acético.

las diferentes condiciones de luz.

Para saber si dicha variación en los datos es causada por la concentración de IAA o por las condiciones de luz se realiza un análisis de varianza (tabla X), quien indica que es la concentración de IAA la principal responsable de la variabilidad en los datos, siendo el peso fresco independiente de las condiciones de luz.

Representando gráficamente el índice de peso fresco (IPF) en función de la concentración de IAA en luz y obscuridad (fig 14), se ve que hay muy poca influencia de la luz sobre esta variable y que existe una relación entre el índice de peso fresco y la interacción IAA-T, lo cual apoya lo encontrado mediante el análisis estadístico.

De esta forma, la gráfica y la tabla de resultados indican que la concentración de IAA más adecuada de las probadas para la producción de masa celular hidratada y en ausencia de cinetina, es de 1 ppm en luz y de 0.1 ppm en obscuridad.

2.- Peso seco

En la tabla XI se muestran los resultados de peso seco. Cada uno de los datos representa el promedio del peso de tres cultivos.

Los datos muestran que la máxima cantidad de masa celular se obtiene a las 4-6 semanas de cultivo, siendo diferente la cantidad según la concentración de IAA, fotocondiciones y tiempo de incubación. Al igual que en el caso de peso fresco, para saber si el efecto causado por los factores evaluados es significativo se realiza un análisis de varianza (tabla X). El resultado de dicho análisis indica que el peso seco se ve profundamente afectado por las condiciones de luz, concentración de IAA, tiempo de incuba--

TABLA X
 RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS DE INDICE DE PESO FRESCO
 (IPF), PESO SECO(PS) Y NUMERO DE CELULAS(NoC) DE LOS
 TRATAMIENTOS QUE NO INVOLUCRAN CINETINA

FUENTE DE VARIACION	G.L.	F.C.			Ft 0.05
		I.P.F.	P.S.	No.C.	
Fotocondiciones	1	1.25191	10.79091	2.44547	3.98
IAA	3	3.81195	13.38030	2.08061	2.74
Tiempo	3	37.75976	21.16172	2.79546	2.74
Fotocondiciones-IAA	3	2.74401	8.81208	1.69774	2.74
Fotocondiciones-Tiempo	3	0.50056	10.01999	2.20432	2.74
IAA-Tiempo	9	2.60356	5.69635	5.13336	2.02
Fotocondiciones-IAA-Tiempo	9	1.41037	9.07790	2.59319	2.02
Error	64				

Fotocondiciones, condiciones de luz y oscuridad; IAA ácido indolacético; F.C. F calculada; Ft 0.05, F teórica tomada de las tablas con un nivel de significancia del 0.05; G.L., grados de libertad; Se considera que hay efecto significativo por los factores evaluados cuando la F.C. es mayor que la Ft.

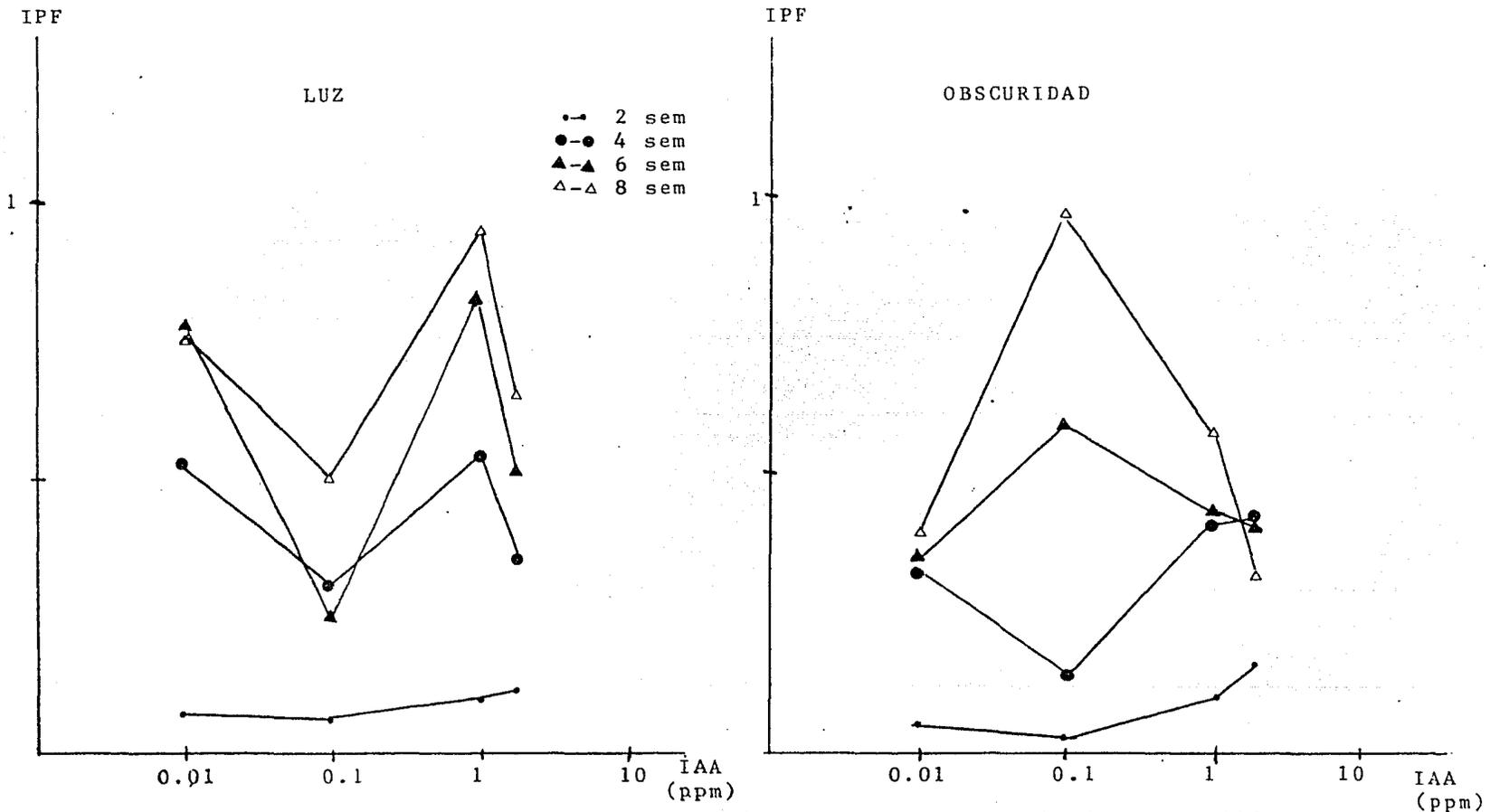


Fig. 14. Índice de peso fresco en función de la concentración de IAA a diferentes periodos de tiempo(2,4,6 y 8 semanas).

TABLA XI
 EFECTO DE LA LUZ Y AUXINA (IAA) SOBRE EL PESO
SECO DE CALLOS OBTENIDOS A DIFERENTES
 PERIODOS DE TIEMPO (T)

	T (Sem)	Acido indolacético (ppm)			
		0.01	<u>0.10</u>	1.00	2.50
L U Z	2	0.0766	0.1065	0.0811	0.1254
	4	0.1177	0.1166	0.0992	0.1400
	6	0.0827	0.1286	0.1446	0.1390
	8	0.1400	0.1266	0.1294	0.0965
OBSCURIDAD	2	0.0833	0.1180	<u>0.0873</u>	0.0965
	4	0.1220	0.1163	0.2500	0.1320
	6	0.1276	0.1084	0.1486	0.1320
	8	0.1120	0.1063	0.1300	0.1449

Cada dato en las celdas representa el promedio de tres cultivos. ppm, concentración en partes por millón. La concentración de IAA subrayada es la en contrada como más adecuada para el peso seco.

ción y la interacción entre los factores, IAA-Luz.

Según la tabla X , el factor de mayor influencia es la concentración de IAA y tiempo de incubación. Debido a que las interacciones entre los factores evaluados tienen efecto muy significativo sobre el peso seco, resulta impredecible el comportamiento del mismo al variar cualquiera de ellos.

De lo anterior, para seleccionar las condiciones de cultivo más adecuadas se representa gráficamente el peso seco en función de la concentración de IAA en luz y oscuridad(fig. 15). De la figura y la tabla de resultados de peso seco se observa que la concentración más adecuada de IAA es de 1 ppm para cualquier caso luz u oscuridad y con cuatro semanas de incubación, aunque en oscuridad es donde se obtiene mayor cantidad de peso seco.

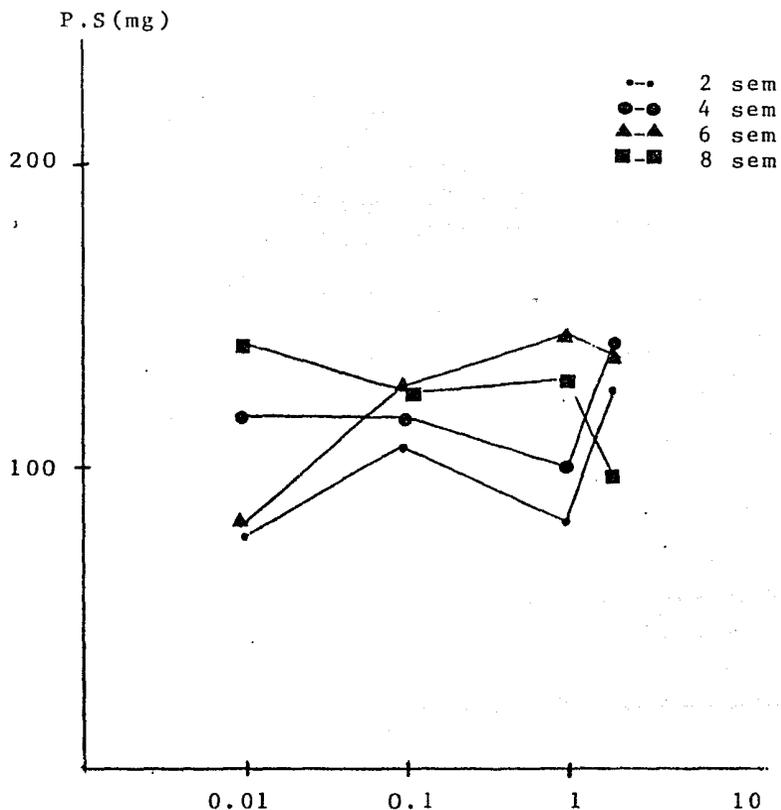
3.- Número de células

Esta variable de respuesta se reporta como absorbancia, determinada a 454 nm, en la tabla XII. El número de células se puede determinar a partir de la curva patrón de absorbancia contra número de células (fig. 13).

De la tabla XII se observa que conforme pasa el tiempo la absorbancia presenta subidas y bajadas lo cual no necesariamente se debe a un incremento en el número de células sino a variaciones en el tamaño y la forma que adquieren en sus diferentes etapas de desarrollo. Al realizar el análisis de varianza con los datos(tabla X), se encuentra que esta variable de respuesta se ve afectada ligeramente por el tiempo de incubación y la interacción de este con la concentración de IAA, además de que existe triple interacción entre estos tres factores.

Para seleccionar las condiciones más adecuadas con respecto al número de células, se grafican estos datos(fig 16) en función

LUZ



OBSCURIDAD

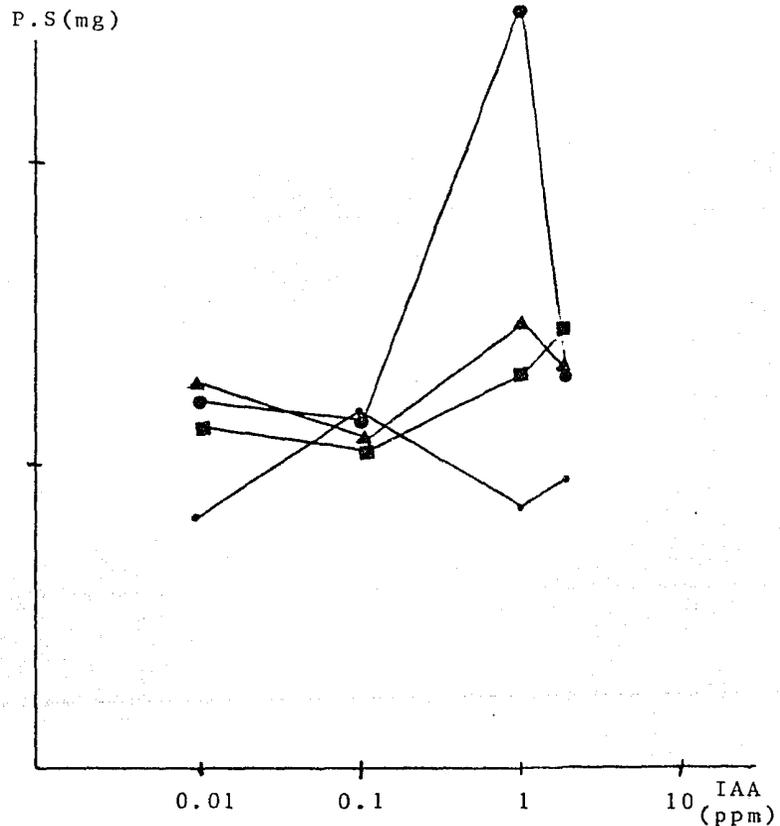


Fig 15. Peso seco (P.S) de callos de cotiledón de semillas de *T. thevetioides* en función de la concentración de ácido indolacético (IAA), a diferentes periodos de incubación (2, 4, 6 y 8 semanas) y en ausencia de cinetina.

TABLA XII
 EFECTO DE LA LUZ Y AUXINA (IAA) SOBRE EL NUMERO
DE CELULAS DE CALLOS A DIFERENTES PERIO
DOS DE TIEMPO (T)

	T (Sem)	Acido indolacético (ppm)			
		0.01	0.10	1.00	<u>2.50</u>
L U Z	2	0.1490	0.1900	0.4193	0.8373
	4	1.0280	0.2137	0.1815	1.0900
	6	0.1560	0.3365	0.2146	0.9600
	8	0.1250	0.3605	0.4100	0.4650
OBSCURIDAD	2	0.1750	0.1150	<u>0.2280</u>	0.5530
	4	0.6115	0.3960	0.1020	0.8200
	6	0.2100	0.4620	0.2430	0.7100
	8	0.1400	0.3743	1.3610	0.5663

Los datos de las celdas son el promedio de tres -
 cultivos. ppm concentración en partes por millón. La
 concentración de IAA subrayada es la encontrada más
 adecuada para el número de células.

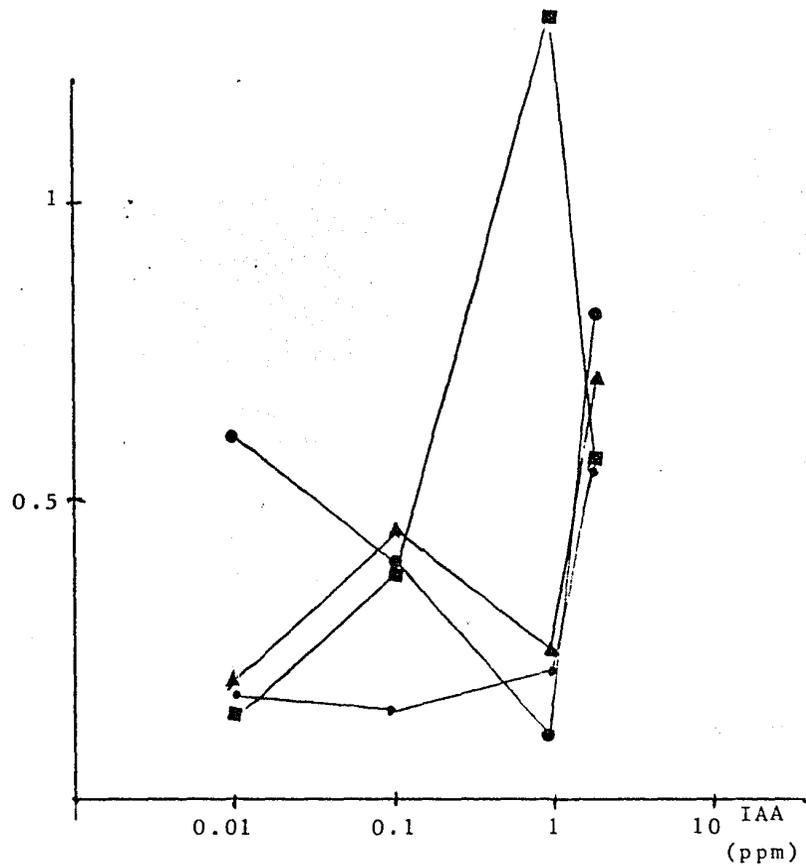
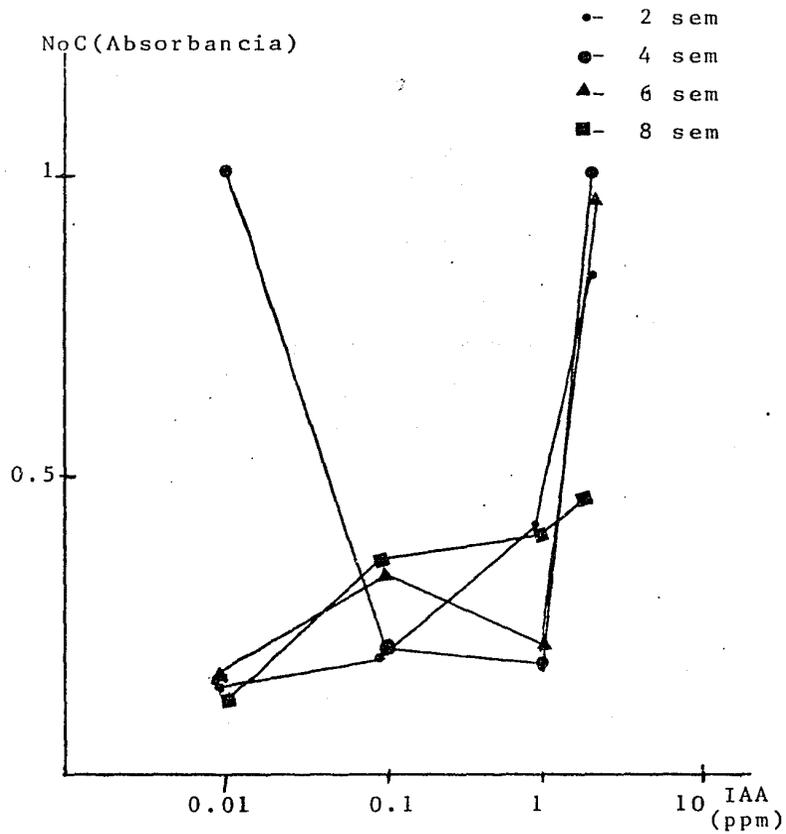


Fig.16. Número de células NoC (en absorbancia) en función de la concentración de ácido indolacético (IAA) a diferentes periodos de incubación (2,4,6 y 8 semanas) y en ausencia de cinetina.

de la concentración de IAA. De esta figura y del cuadro de resultados se observa que la mejor concentración de IAA es de 2.5 ppm con cuatro semanas de incubación en luz y de 1 ppm con ocho semanas de incubación en oscuridad, aunque como se mencionó anteriormente esta variable de respuesta no se puede considerar esencial para tomar una decisión final de selección de condiciones de trabajo para la producción y mantenimiento de callos.

4.- Friabilidad

En la tabla XIII se reportan los resultados de la friabilidad celular e indica que esta variable de respuesta tiende a aumentar conforme se incrementa la concentración de IAA tanto en luz como en oscuridad, hasta llegar a una ppm donde permanece mas o menos constante en luz y disminuye en oscuridad.

El análisis estadístico de estos datos (tabla XIV) muestra que la friabilidad se ve fuertemente afectada por la concentración de IAA y un poco menos por las condiciones de luz y la interacción entre estos dos factores. De esta manera, al representar gráficamente el porcentaje de friabilidad en función de la concentración de IAA en luz y oscuridad (fig 17) se puede observar claramente el cambio en la respuesta con respecto a las condiciones de luz. De esta representación y el cuadro de resultados se encuentra que las mejores condiciones de cultivo para la friabilidad son; oscuridad y 1 ppm de IAA.

TABLA XIII
EFECTO DE LA LUZ Y AUXINA (IAA) SOBRE LA FRIABILIDAD DE CALLOS DE OCHO SEMANAS DE EDAD DEL CULTIVO

FOTOCONDICIONES	ACIDO INDOL ACETICO (ppm)			
	0.01	0.10	1.00	2.50
LUZ	7.4900	13.4350	16.7030	16.3733
OBSCURIDAD	1.3239	15.4266	49.8925	14.8000

TABLA XIV
RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS DE FRIABILIDAD (%) COMO FUNCION DE LA LUZ Y CONCENTRACION DE AUXINA

FUENTE DE VARIACION	G.L.	M.C.	F.C.	F.T. 0.05
FOTOCONDICIONES	1	282.1934	26.8351	4.490
AUXINA (IAA)	3	865.4589	20.9600	3.240
FOTOCONDICIONES-AUXINA (IAA)	3	478.8830	11.6000	3.240
ERROR	16	41.2854		

Fotocondiciones. luz y obscuridad; IAA ácido indolacético; G.L. grados de libertad; M.C. media de cuadrados; F.C. F calculada; F.T. 0.05 F teórica con un nivel de significancia de 0.05. Se considera que hay efecto sobre la friabilidad por las fuentes de variación cuando la F.C. es mayor que la F.T.

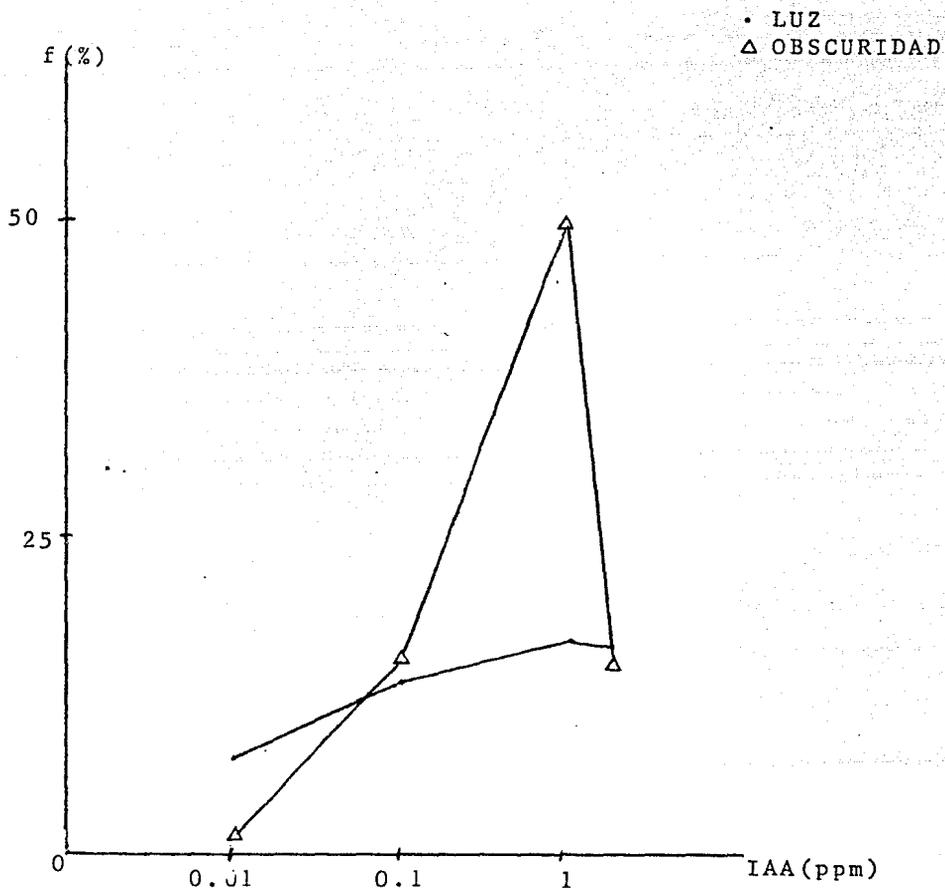


Fig. 17. Porcentaje de friabilidad (%f) en función de la concentración de ácido indolacético (IAA) en luz y oscuridad.

5.- Contenido de cardiotónicos

Esta determinación se realiza con los cultivos obtenidos a partir de yemas como explantes y previa identificación de los tevetósidos totales (mezcla) mediante cromatografía en capa fina, usando como estándar una mezcla de tevetósidos extraídos de semillas de T. thevetioides en los laboratorios de orgánica de la ENEP ZARAGOZA.

Los resultados de tevetósidos totales se presentan en la tabla XV. Para la evaluación del contenido de cardiotónicos se juntan las masas celulares de tres cultivos, por lo que en este caso no se cuenta con repeticiones y no es posible calcular la triple interacción entre los factores mediante el análisis de varianza.

Los datos presentan mucha variación por lo cual es difícil analizarlos directamente. Su análisis estadístico (tabla XVI), indica que la cantidad de tevetósidos por gramo de callo no se ve afectada por la variación en las concentraciones de IAA ni luz.

La representación gráfica del contenido de cardiotónicos en función de la concentración de IAA (fig 18) muestra que la variación en los datos se debe a interacciones entre las condiciones de luz y concentraciones de IAA y no a efectos individuales de alguno de estos factores, que va de acuerdo con lo encontrado estadísticamente.

Por lo anterior se deduce que al usar una concentración de 0.1 ppm de IAA y obscuridad se obtienen mejores resultados para el contenido de tevetósidos.

TABLA XV

EFECTO DE LA LUZ Y AUXINA (IAA) SOBRE EL CONTENIDO DE CARDIOTONICOS (mg/g) EN CALLOS DE OCHO SEMANAS DE EDAD (Y)

FOTOCONDI CIONES	Acido indolacético (ppm)			
	0.01	0.10	1.00	2.50
LUZ	14.4578	2.0193	2.1828	3.3409
OBSCURIDAD	1.4826	23.7541	1.3299	0.6402

Los datos estan dados en mg de tevetósidos por gramo de tejido fresco. Para cada dato se juntaron las masas celulares de tres cultivos de yemas (Y). La concentración del dato subrayado es la que se encontró más adecuada para la producción de tevetósidos. ppm; partes por millón.

TABLA XVI

RESULTADO DEL ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS DE CONTENIDO DE TEVELOSIDOS EN FUNCION DE LA LUZ Y CONCENTRACION DE AUXINA IAA

FUENTE DE VARIACION	G.L.	M.C.	F.C.	F.T. _{0.05}
Fotocondiciones	1	3.38768	0.03166	10.130
Auxina (IAA)	3	56.86751	0.53147	9.280
Error	3	107.00056		

Fotocondiciones, luz y obscuridad; IAA, ácido indolacético; G.L., grados de libertad; M.C., media de cuadrados; F.C.; F - calculada; F.T._{0.05} F teórica con un nivel de significancia de 0.05%. Se considera que hay efecto significativo cuando la F.C. es mayor que la F.T.

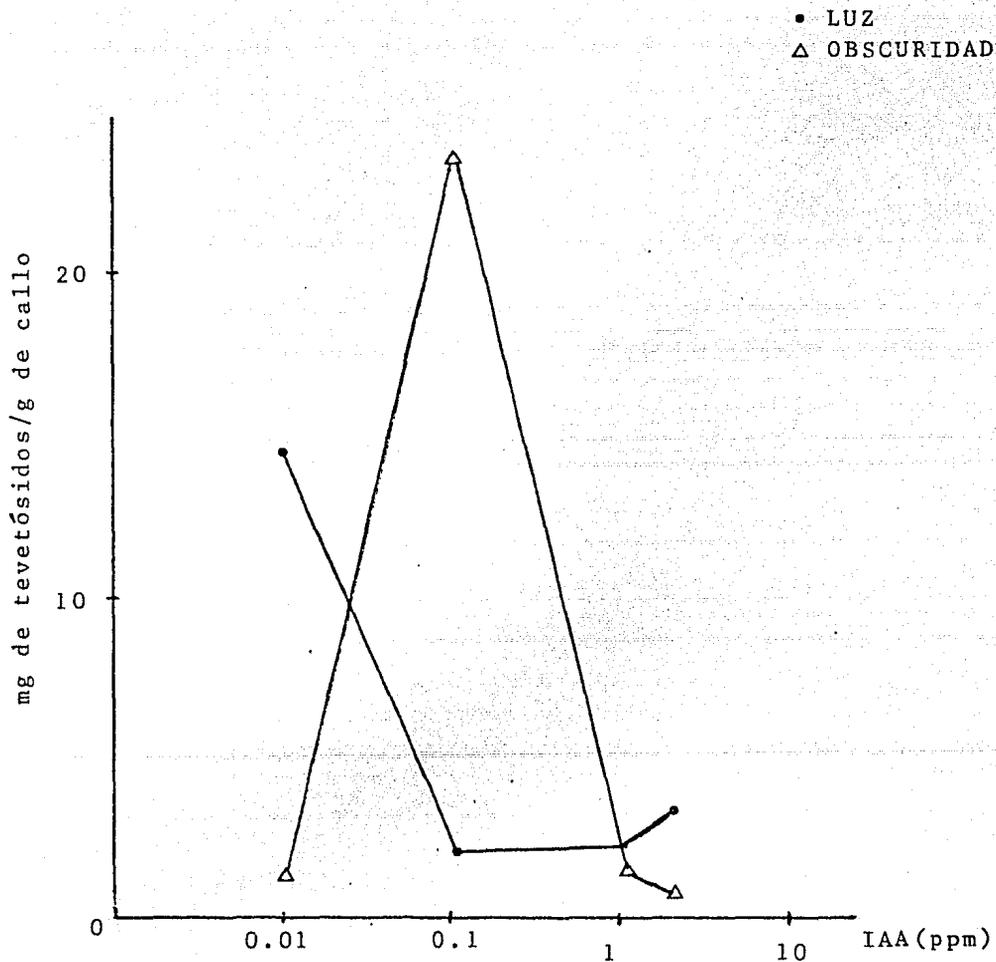


Fig. 18. Contenido de tevetósidos en mg por g de callo en función de la concentración de IAA en luz y obscuridad.

7.5.2 TRATAMIENTOS QUE INVOLUCRAN LA RELACION HORMONAL IAA/C.

En la parte anterior se trataron los datos obtenidos cuando el medio de cultivo contiene IAA como única hormona de crecimiento, por lo cual, aunque dichos datos se incluyen en los cuadros de resultados que se presentan en esta parte, no se toman en cuenta para realizar el análisis de los mismos. Su inclusión en esta parte sólo es útil para visualizar mejor la posterior discusión de los resultados.

El análisis estadístico de los datos se realiza con los resultados obtenidos a las seis semanas de cultivo en el caso de peso fresco, peso seco y número de células, y a las ocho para los de friabilidad y contenido de tevetósidos.

1.- Peso fresco

Estos datos se reportan como índice de peso fresco (IPF) y se muestran en la tabla XVII, en la que se observa que el peso fresco es afectado por los tres factores evaluados. Para saber si tal efecto es estadísticamente significativo se realiza un análisis de varianza (tabla XVIII), quien indica que la IAA, C y luz producen por sí mismos un efecto significativo sobre el peso fresco, siendo las concentraciones hormonales quienes presentan la mayor influencia.

La tabla de análisis estadístico también muestra que no existe efecto por la doble interacción fotocondiciones-C, fotocondiciones-IAA o por la triple interacción, aunque la interacción entre las hormonas (IAA-C) sí produce un fuerte efecto en el peso fresco.

La representación gráfica del IPF en función de la concentración de IAA (fig. 19), muestra que la variación del índice de

TABLA XVII
 EFECTO DE LA LUZ Y BALANCE HORMONAL AUXINA/CITOCININA
 (IAA/C) SOBRE EL INDICE DE PESO FRESCO (IPF)
 DE CALLOS DE COTILEDON DE SEIS
 SEMANAS DE EDAD

	Cinetina (ppm)	Acido indolacético (ppm)			
		0.01	0.10	1.00	2.50
L U Z	0.00	7.6416	2.3866	8.2358	5.1000
	0.05	3.2690	4.1000	7.8730	4.5230
	0.25	3.2500	2.3740	2.9340	6.6210
	1.00	2.7333	8.1960	3.6710	<u>10.6650</u>
	1.50	3.6530	5.4940	6.5970	6.0510
	O B S C U R I D A D	0.00	3.8716	5.9166	4.3621
0.05		2.1850	1.9500	8.1150	3.4480
0.25		6.3000	2.2000	2.6800	6.4100
1.00		6.0580	6.5080	2.6900	<u>9.6700</u>
1.50		2.7240	3.9860	6.0160	1.6270

IPF= (Peso fresco del callo - peso fresco del explante)/peso fresco del explante. El dato subrayado corresponde al tratamiento encontrado como más adecuado para la producción de peso fresco. ppm, concentración en partes - por millón.

TABLA XVIII

RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS DE LOS TRATAMIENTOS QUE
INVOLUCRAN EL BALANCE HORMONAL AUXINA/CITOCININA
(ACIDO INDOL ACETICO/CINETINA IAA/C)

FUENTE DE VARIACION	G.L.	F.C.				F.T. _{0.05}
		I.P.F.	P.S.	No.C.	%F	
Fotocondiciones	1	4.2582	7.6702	2.1424	6.4433	3.98
Acido indolacético (IAA)	3	7.3930	5.3174	6.2866	6.5782	2.74
Cinetina(C)	3	5.1557	10.8164	5.1796	4.6082	2.74
INTERACCIONES						
Fotocondiciones-IAA	3	2.0654	2.9215	3.3591	1.4908	2.74
Fotocondiciones-C	3	2.3206	5.5971	2.2139	0.1365	2.74
IAA-C	9	9.9629	10.8914	2.0611	2.7312	2.02
Fotocondiciones- -IAA-C	9	0.6748	5.3459	1.3972	0.9802	2.02
Error	64					

Fotocondiciones: luz y oscuridad; F.C., F calculada; F.T._{0.05} F teórica con 0.05% de significancia. I.P.F., índice de peso fresco; G.L., grados de libertad; P.S., peso seco; No.C., número de células; %F, porciento de friabilidad celular. Se considera que existe efecto significativo por la fuente de variación cuando la F.C. es mayor que la F.T.

peso fresco con respecto a las concentraciones hormonales, no si gue una secuencia l6gica y que las condiciones de luz pr6ctica-- mente no causan ning6n efecto sobre esta variable de respuesta, que concuerda con lo encontrado mediante el an6lisis estadístico (tabla XVIII).

Un esbozo de los datos en tres dimensiones, lo que da una superficie de respuesta del IPF en funci6n de la concentraci6n de IAA y C (fig 20), muestra que en ambos casos, luz y obscuridad, las respuestas son muy bajas en las esquinas y en la parte central de los intervalos de las concentraciones hormonales utilizadas. Esto quiere decir que las concentraciones m6s adecuadas de IAA y C se encuentran en los bordes y no en las esquinas o centro de la superficie de respuesta.

De lo anterior se deduce que los tratamientos que rinden ma yor peso fresco deben de ser los que se encuentran en los extremos de la matriz experimental. De la tabla de resultados de IPF, y de las gr6ficas mencionadas se observa que el tratamiento que presenta mayor rendimiento de peso fresco es el 16, en ambos casos, luz y obscuridad, que efectivamente, se encuentra en uno de los extremos de la matriz experimental. Dicho tratamiento corres ponde a las concentraciones de 2.5 ppm de IAA y 1 ppm de C.

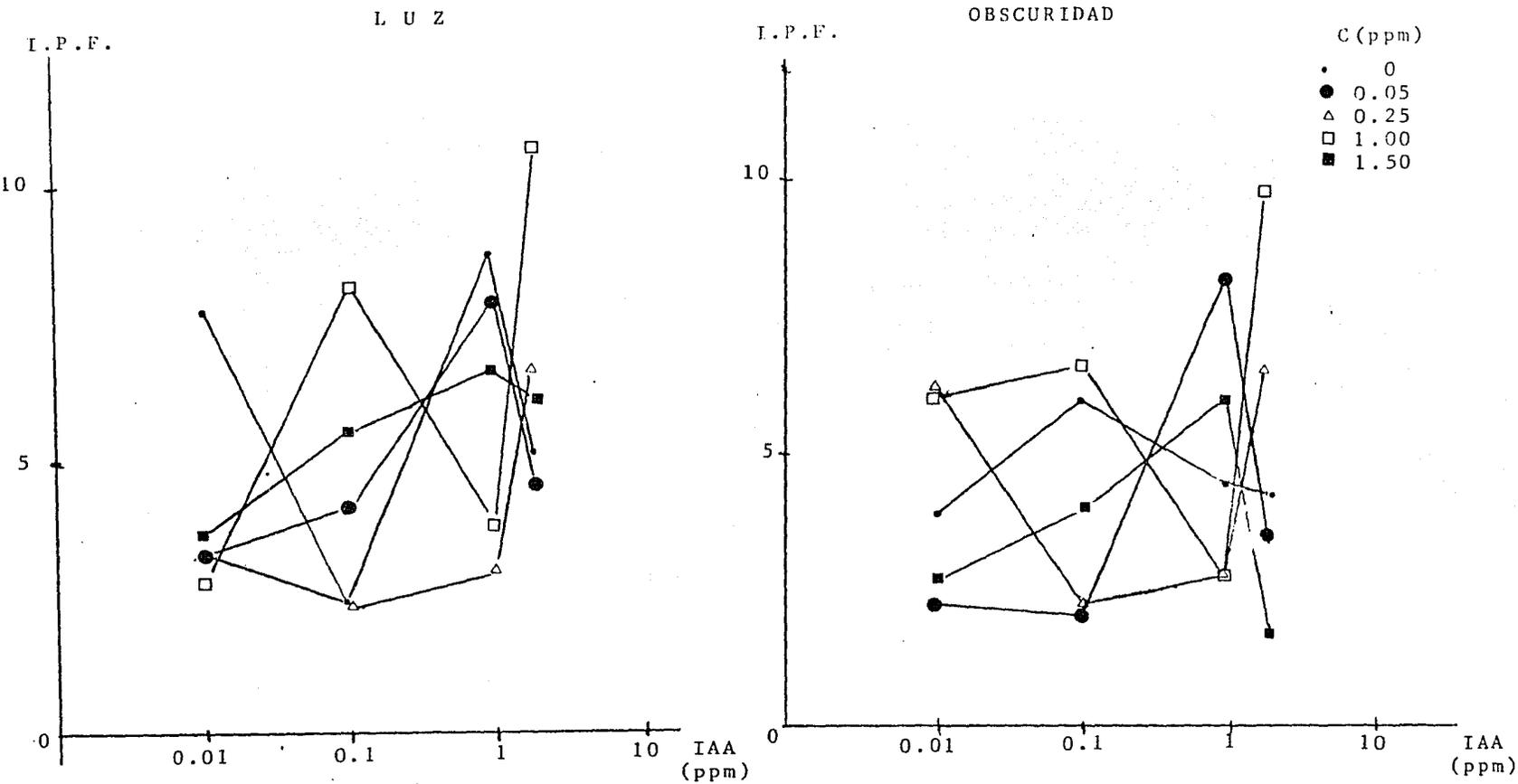
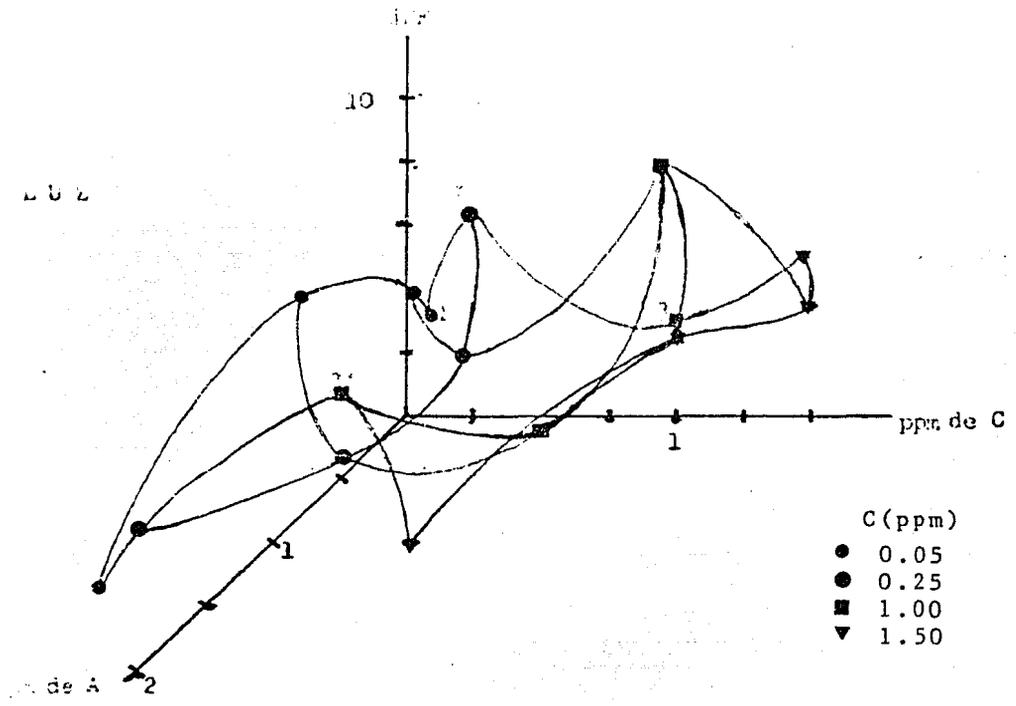


Fig. 19. Índice de peso fresco (IPF) en función de la concentración de ácido indolacético (IAA) y a diferentes concentraciones de cinetina (C) en condiciones de luz y obscuridad. ppm; partes por millón.

132



133

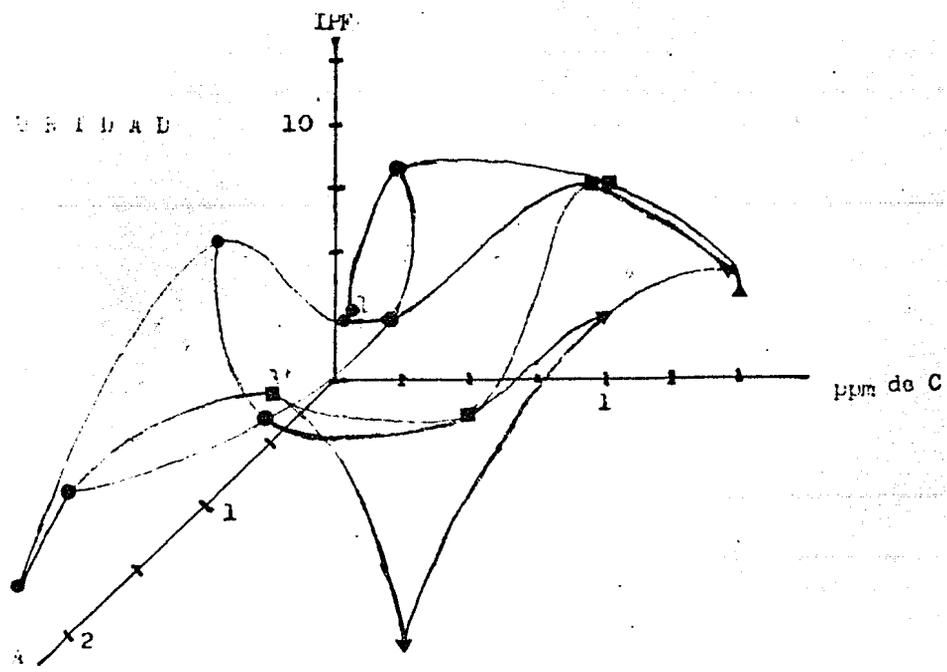


Fig. 20. Indice de peso fresco (IPF) de callos de cotiledones de semillas de *Thevetia thevetoides* en dependencia de la concentración de ácido indolacético y citocinina (A y C respectivamente). ppm, concentración en partes por millón.

2.- Peso seco

Estos datos se dan en la tabla XIX. La gran variación que se observa en ellos indica que es conveniente realizar un análisis estadístico para saber que factor influye con mayor fuerza en esta variable de respuesta. El resultado de este análisis se presenta en la tabla XVII, quien muestra que existe doble y triple interacción entre los factores evaluados. Además de que cada factor afecta de manera individual el peso seco. De lo anterior se deduce que al variar cualquiera de los factores el peso seco se verá afectado fuertemente y variará de manera impredecible.

El análisis estadístico también muestra que la interacción entre las hormonas (IAA-C) es quien causa el mayor efecto sobre el peso seco, por lo que pequeños cambios en las concentraciones hormonales provocarán grandes cambios en esta variable de respuesta.

La representación gráfica del peso seco en función de la concentración de C en luz y obscuridad muestra que hay cierta dependencia del peso seco con respecto a cada uno de los factores evaluados, lo que concuerda con lo encontrado estadísticamente, aunque tal dependencia no sigue una relación lógica que pueda explicar la variación en los datos (fig. 21).

La representación de los datos en tres dimensiones (fig 22) muestra más claramente la tendencia de los datos hacia las condiciones de cultivo más adecuadas para esta variable de respuesta. Estas superficies de respuesta indican que para luz, los datos tienden a acumularse o crecer en 2.5 ppm de IAA y 1 ppm de C mientras en obscuridad las concentraciones más adecuadas son de 2.5 ppm de IAA y de 1.5 ppm de C.

TABLA XIX
 EFECTO DE LA LUZ Y BALANCE HORMONAL AUXINA/CITOCININA
 (IAA/C) SOBRE EL PESO SECO DE CALLOS DE
 COTILEDONES DE SEIS SEMANAS

	Cinetina (ppm)	Acido indolacético (ppm)			
		0.01	0.10	1.00	2.50
L U Z	0.00	0.0827	0.1286	0.1446	0.1390
	0.05	0.0840	0.0720	0.1340	0.0970
	0.25	0.1105	0.1196	0.1434	0.1400
	1.00	0.1300	0.1190	0.0870	<u>0.1860</u>
	1.50	0.1070	0.1460	0.0940	0.1300
O B S C U R I D A D	0.00	0.1276	0.1084	0.1486	0.1350
	0.05	0.1030	0.0810	0.1250	0.1070
	0.25	0.0890	0.1230	0.1270	0.0900
	1.00	0.1120	0.1550	0.0800	0.1200
	1.50	0.0800	0.1090	0.0990	<u>0.1890</u>

Cada celda representa el peso seco promedio en gramos, de tres cultivos de seis semanas de incubación. Los datos subrayados corresponden a las condiciones de cultivo más adecuadas para la producción de peso seco.

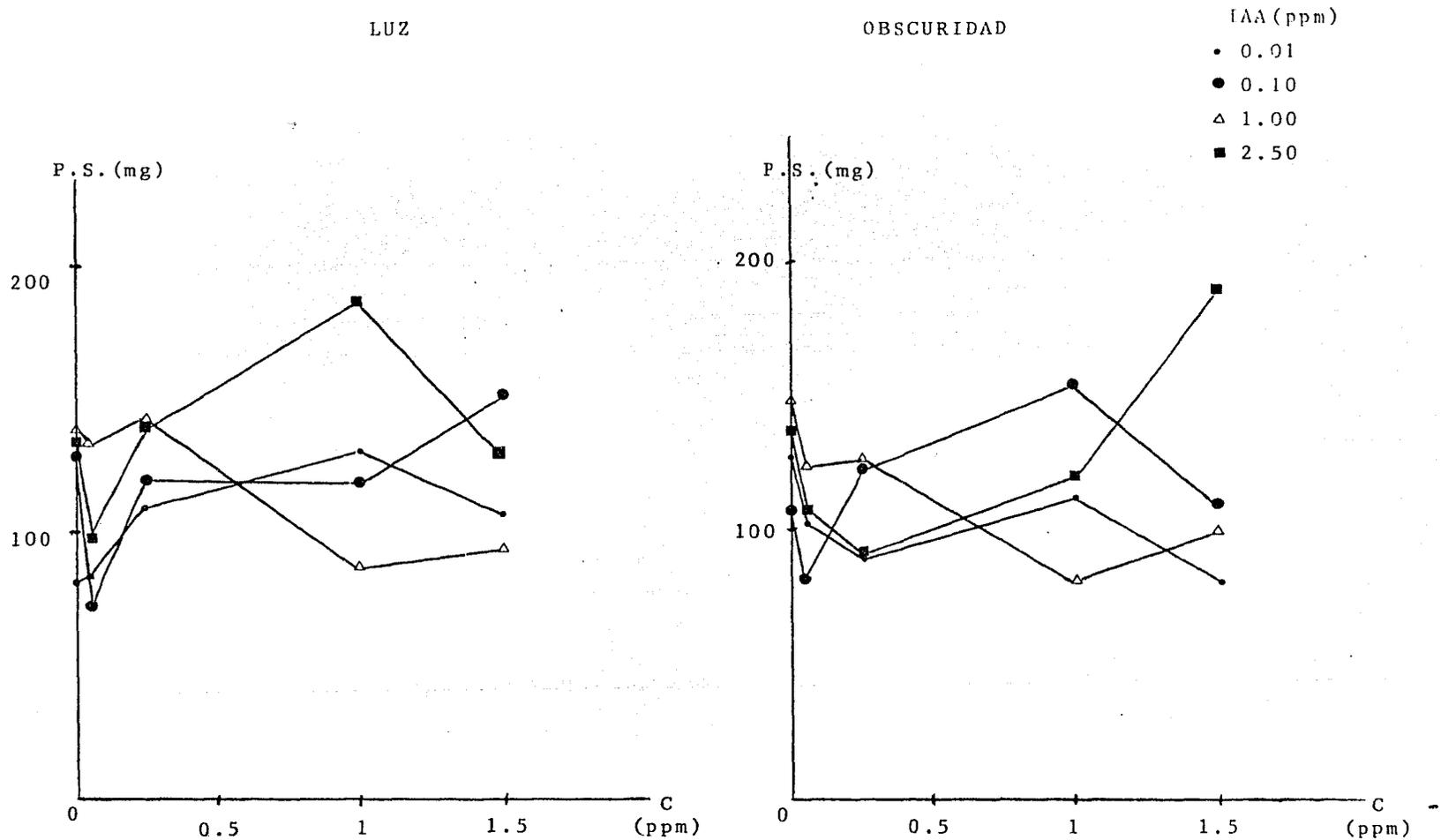


Fig. 21. Peso seco (PS en miligramos) de callos de cotiledones de *T. tevetoides* en función de la concentración de cinetina (C) a diferentes concentraciones de ácido indolacético (IAA) en luz y obscuridad. ppm, concentración en partes por millón.

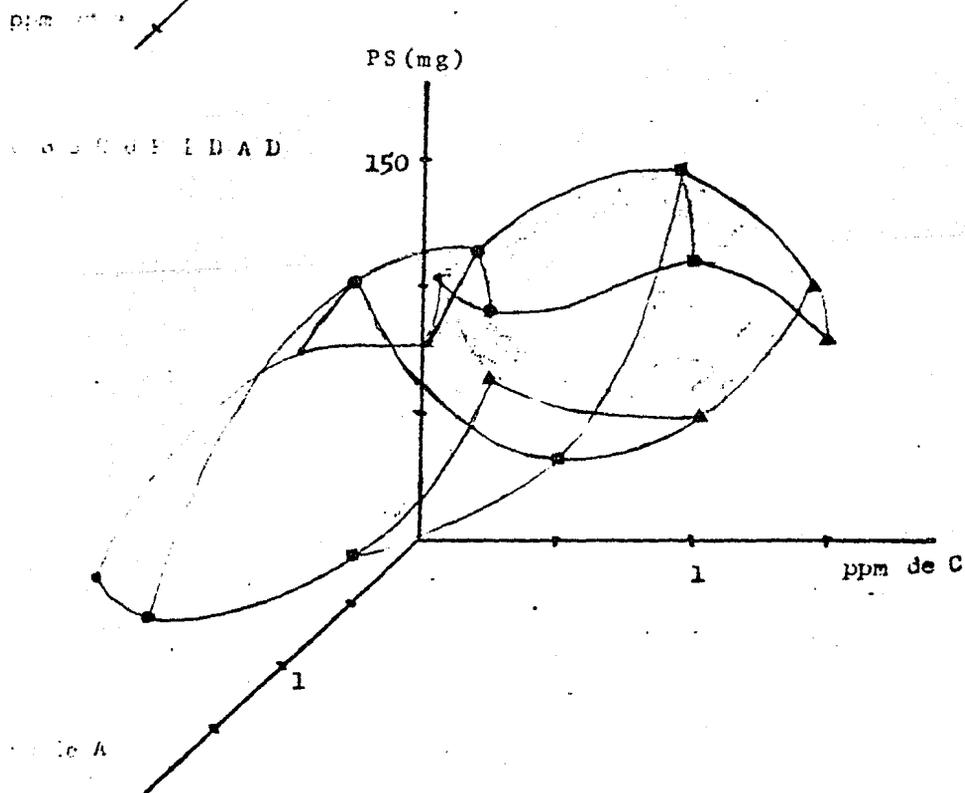
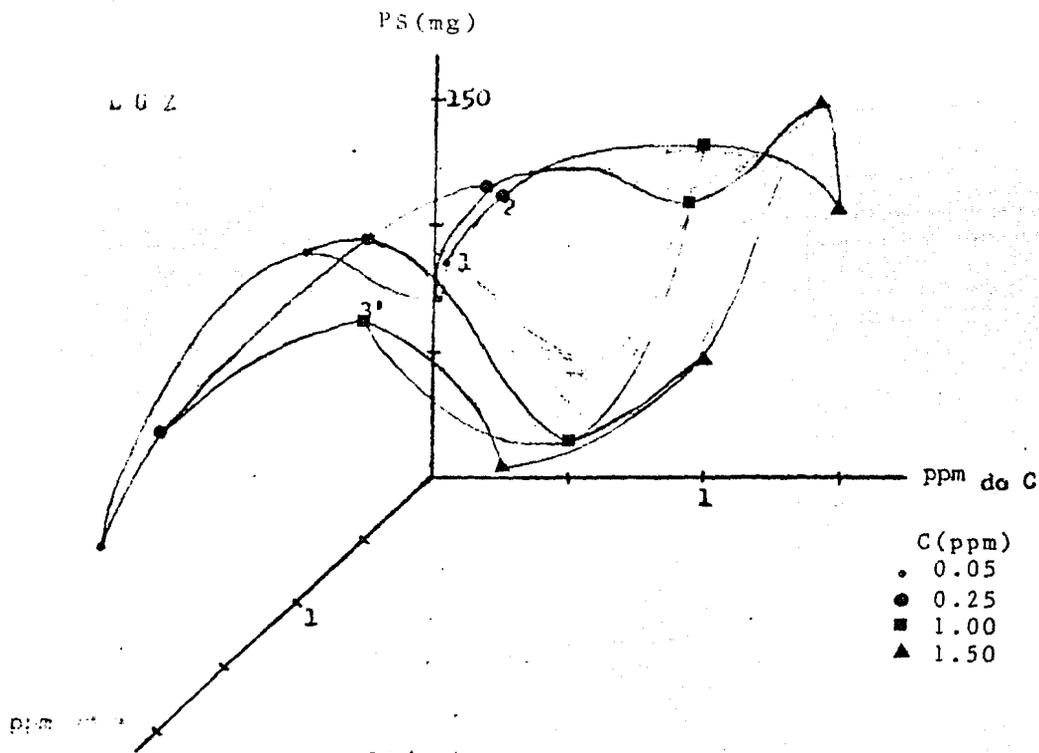


Fig. 22. Peso seco de callos de cotiledon de semillas de T.thevetoides en dependencia de la concentración de ácido indolacético IAA y cinetina C.

3.- Número de células

Estos datos se dan en la tabla XX, donde se observa una gran variación. La tendencia de los datos no puede observarse por simple inspección de la tabla por lo que se analizan estadísticamente para saber cual de los factores es el que origina tal variación en los resultados.

El análisis estadístico (tabla XVII) indica que la variación en los resultados se debe a interacciones entre las hormonas (IAA-C) y entre fotocondiciones-IAA, además la tabla también indica que los factores que ejercen mayor influencia sobre el número de células son las concentraciones hormonales, de forma individual.

Para observar el tipo de interacción entre fotocondiciones-IAA, se representa gráficamente el número de células en función de la concentración de IAA (fig 23). Esta gráfica muestra que la interacción IAA-fotocondiciones, afecta el número de células pero de una manera impredecible y desordenada, por lo que dicha gráfica no ayuda a explicar por sí sola el comportamiento de esta variable de respuesta al mover cualquiera de los tres factores.

Recopilando entonces la información que da el cuadro de resultados, el análisis estadístico y la gráfica anterior, se observa que el tratamiento que produce mejores resultados con el número de células es el 7, en luz y en oscuridad. Tal tratamiento corresponde a 0.05 ppm de C y 1 ppm de IAA.

Se debe recordar sin embargo, que esta variable de respuesta se ve afectada por el tamaño y forma de las células, por lo que no es una variable determinante para poder dar una conclusión.

TABLA XX
 EFECTO DE LA LUZ Y BALANCE HORMONAL AUXINA/CITOCININA
 (IAA/C) SOBRE EL NUMERO DE CELULAS DE CALLOS
 DE COTILEDON DE SEIS SEMANAS

	Cinetina (ppm)	Acido indolacético(ppm)			
		0.01	0.10	1.00	2.50
L U Z	0.00	0.1560	0.3365	0.2146	0.9600
	0.05	0.4590	0.5300	<u>0.8540</u>	0.4620
	0.25	0.1950	0.1160	0.3370	0.2270
	1.00	0.1890	0.5280	0.4630	0.2640
	1.50	0.4080	0.4570	0.1010	0.4610
O B S C U R I D A D	0.00	0.2110	0.4620	0.2430	<u>0.7110</u>
	0.05	0.4100	0.1000	<u>0.8050</u>	0.2740
	0.25	0.2050	0.2250	0.5090	0.6190
	1.00	0.2080	0.4400	0.4990	0.1690
	1.50	0.3330	0.3410	0.3550	0.1160

Los datos se dan en absorbacia, encontrada en suspensiones de células obtenidas a partir de callos de seis semanas de incubación. Los datos subrayados son los que indican las condiciones de cultivo más adecuadas para producir el mayor número de células. ppm, concentración en partes por millón.

L U Z

OBSCURIDAD

C (ppm)

- 0.00
- 0.05
- ▲ 0.25
- 1.00
- 1.50

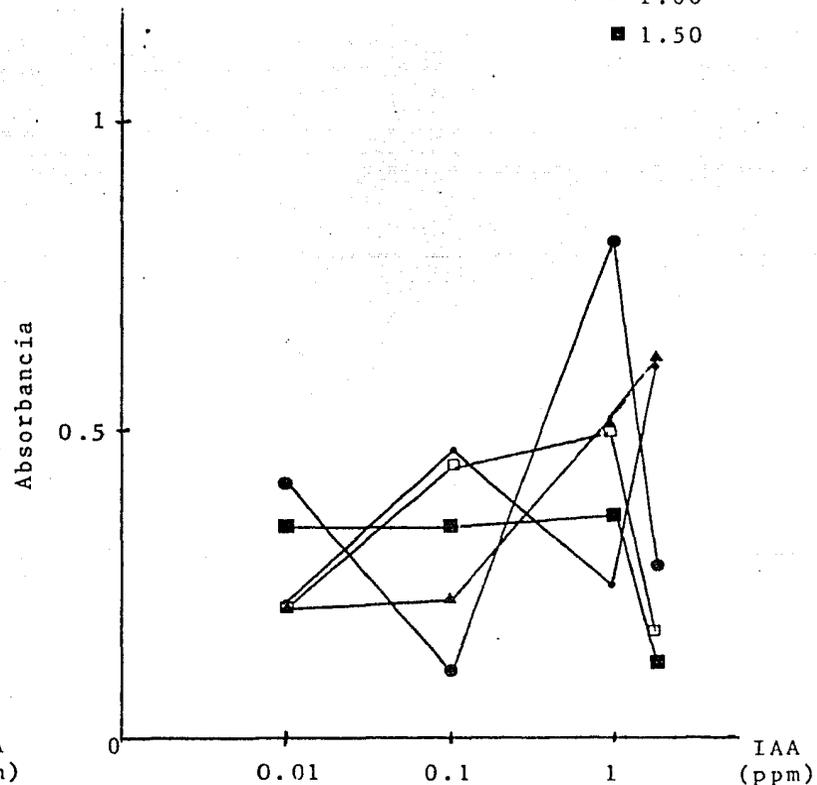
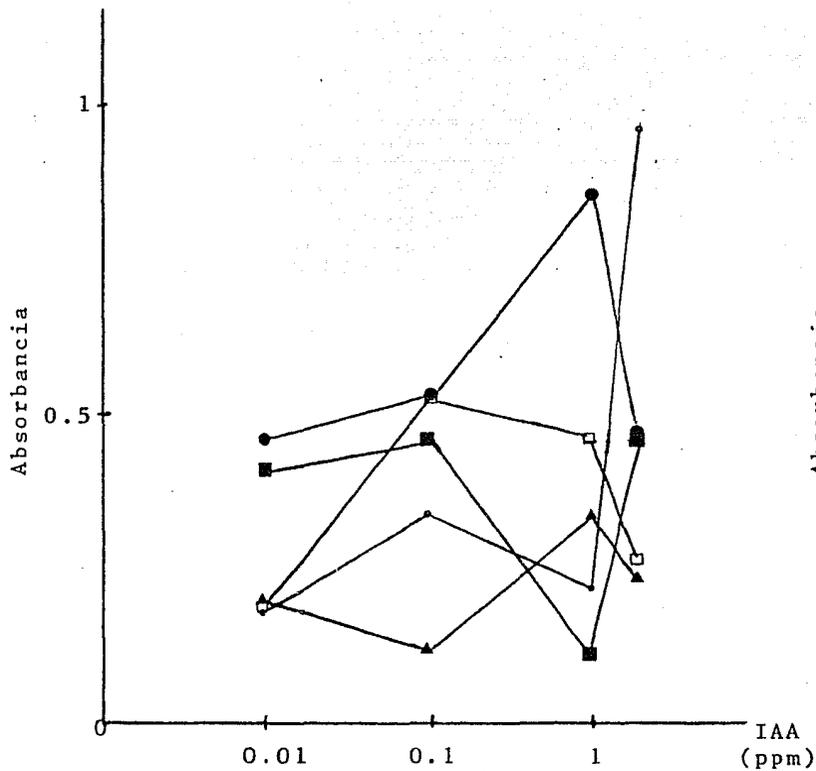


Fig. 23. Número de células (en absorbancia) en función de la concentración de IAA y a diferentes concentraciones de cinetina C, en condiciones de luz y obscuridad. ppm, partes por millón.

4.- Friabilidad celular

En la tabla XXI se presentan los resultados de friabilidad celular. En dicha tabla se observa como los callos en presencia de luz son más friables al aumentar la concentración de IAA al principio y luego la friabilidad desciende, mientras con la C, en ambos casos, luz y oscuridad, hay un aumento con la concentración hasta 1 ppm donde comienza a descender.

Para saber cual de los factores evaluados es el responsable de ese comportamiento, se realiza un análisis de varianza con los datos (tabla XVIII), quien indica que los tres factores producen efecto de manera individual además de sus interacciones. La interacción entre las concentraciones hormonales es la que produce mayor efecto en esta variable de respuesta, de donde se ve que el balance hormonal IAA/C es un factor determinante para obtener callos con friabilidad adecuada.

Al representar la friabilidad en función de la concentración de IAA (fig. 24), se encuentra que la luz y oscuridad producen efectos muy diferentes sobre la friabilidad celular. En presencia de luz (fig 24A), se observa un comportamiento desordenado de los datos, mientras en oscuridad (fig. 24B), parece ser que, a excepción de lo que ocurre con 0.25 ppm de C, la friabilidad aumenta al aumentar la concentración de IAA, pasando por intervalos donde parece permanecer constante.

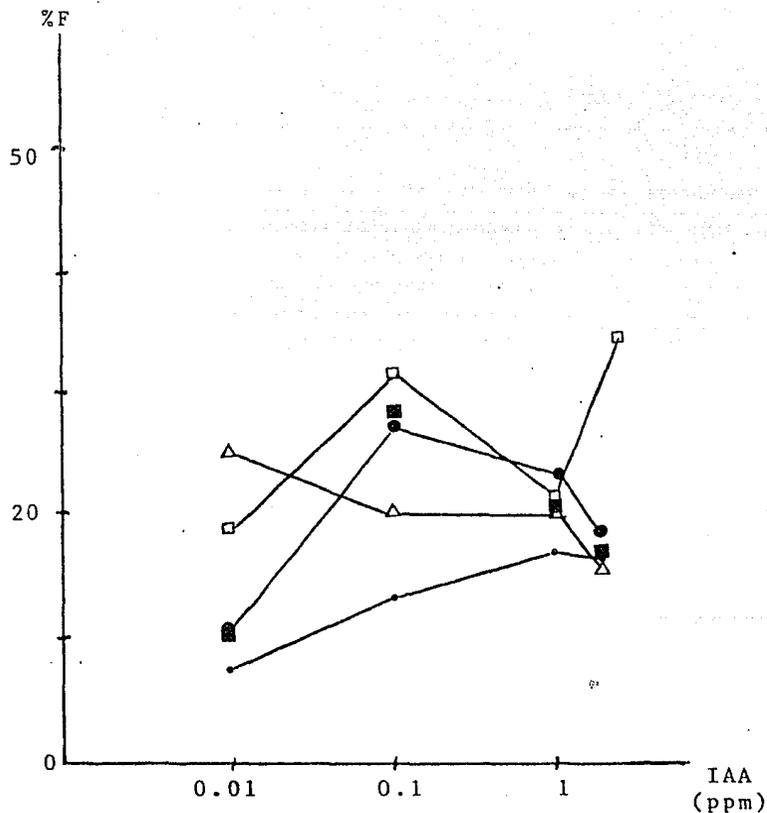
Recopilando la información de las gráficas, resultados y análisis estadístico, el tratamiento que proporciona una friabilidad más adecuada para nuestros propósitos es el 16, correspondiente a 2,5 ppm de IAA y 1 ppm de C, tanto en luz como en oscuridad.

TABLA XXI
 EFECTO DE LA LUZ Y BALANCE HORMONAL AUXINA/CITOCININA
 (IAA/C) SOBRE LA FRIABILIDAD(%) DE CALLOS
 DE SEIS SEMANAS DE EDAD

	Cinetina (ppm)	Acido indolacético(ppm)			
		0.01	0.10	1.00	2.50
L U Z	0.00	7.4900	13.4350	16.7030	16.3733
	0.05	10.9666	27.3200	23.4572	18.5550
	0.25	25.2670	21.4343	20.3366	15.9466
	1.00	19.5633	31.8500	21.9066	<u>34.2140</u>
	1.50	10.3500	28.3333	21.4800	16.5000
OBSCURIDAD	0.00	1.3239	13.4350	16.7030	16.3733
	0.05	12.5400	19.6070	15.9593	18.9800
	0.25	12.9180	18.8300	17.5750	11.3856
	1.00	12.8353	14.4866	26.3050	<u>38.4666</u>
	1.50	9.4700	20.1300	19.8100	25.5000

Los datos subrayados representan los tratamientos con las condiciones de cultivo más adecuadas para obtener callos friables. ppm, concentración en partes por millón.

A LUZ



B OBSCURIDAD

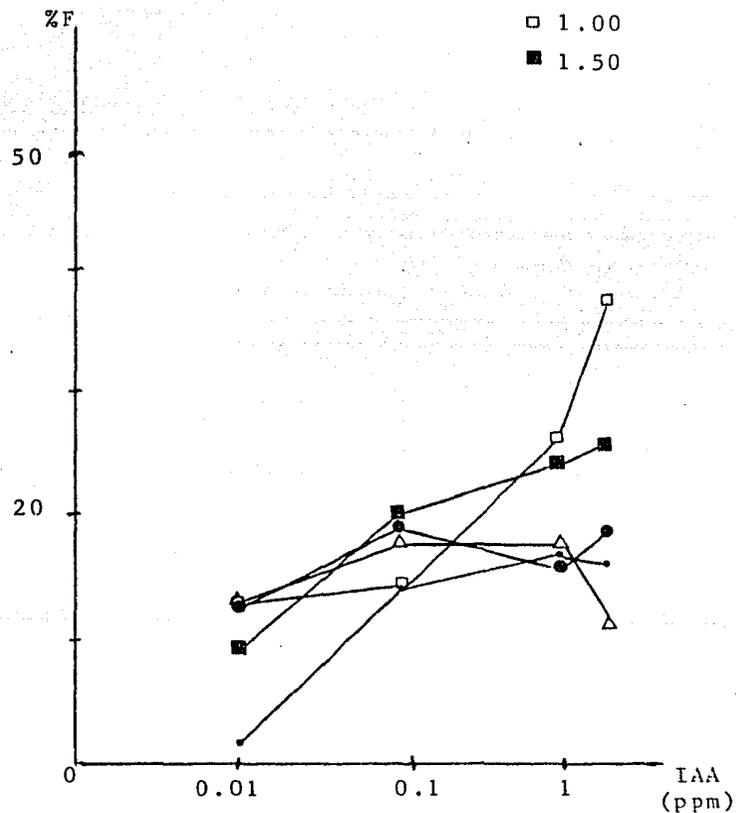


fig. 24. Porcentaje de friabilidad de callos de *T. thevetioides* de ocho semanas de edad, en función de la concentración de IAA y a diferentes concentraciones de cinetina C y condiciones de luz. ppm, partes por millón.

5.- Contenido de cardiotónicos

En la tabla XXII se muestran los resultados de contenido de cardiotónicos en mg de tevetódifod por gramo de callo fresco.

En dicha tabla se observa que los resultados muestran cierta tendencia hacia los tratamientos que contienen concentraciones -- hormonales más altas.

Con el análisis estadístico de los datos (tabla XXIII), se ve que el factor responsable de la variabilidad en ellos es la interacción IAA-C y la concentración de C.

En este caso no se puede calcular la triple interacción debido a que sólo se cuenta con un dato por celda. No obstante, la representación gráfica del contenido de tevetósidos en función -- de la concentración de C (fig. 25) indica que no hay triple interacción, ya que al parecer se obtienen los mismos resultados en luz y oscuridad. De esta gráfica se puede observar que , en general, el contenido de tevetósidos se mantiene constante al aumentar la concentración de C para todas las concentraciones de IAA, excepto en el caso de oscuridad donde con 2.5 ppm de IAA y 0.05 de C el primer punto se dispara muy arriba. Después de 1 ppm de C, el contenido de tevetósidos aumenta notablemente cuando la -- concentración de IAA es de 0.01 ppm o de 1 ppm, siendo mayor -- con la última.

Regresando a la tabla de resultados, la gráfica y con el análisis estadístico se encuentra que el tratamiento más adecuado para producir cardiotónicos es el 19, el cual corresponde a 1 ppm -- de IAA y 1.5 ppm de C, en ambos casos; luz y oscuridad.

TABLA XXII
 EFECTO DE LA LUZ Y BALANCE HORMONAL AUXINA/CITOCININA
 (IAA/C) SOBRE EL CONTENIDO DE CARDIOTONICOS
 (mg/g) EN CALLOS DE OCHO SEMANAS

	Cinetina (ppm)	Acido indolacético (ppm)			
		0.01	0.10	1.00	2.50
L U Z	0.00	14.4578	2.0193	2.1828	3.3409
	0.05	2.8203	4.7831	3.6150	4.6819
	0.25	1.4491	5.5573	2.1326	2.9360
	1.00	1.2917	1.2616	2.2254	1.4939
	1.50	<u>43.9992</u>	1.5636	61.6419	5.0363
O B S C U R I D A D	0.00	1.4826	23.7541	1.3299	0.6402
	0.05	8.4484	4.1018	1.8254	<u>74.3958</u>
	0.25	5.1376	6.3837	2.7678	1.6278
	1.00	1.3170	3.7549	2.7207	1.9923
	1.50	14.8617	0.5978	<u>86.0022</u>	9.2005

La determinación del contenido de cardiotónicos se realizó juntando la masa celular fresca de tres cultivos de yemas de ocho semanas de edad. Los datos están dados en mg de cardiotónicos (tevetósidos) por gramo de callo fresco. Los datos subrayados corresponden a los tratamientos que producen mayor cantidad de cardiotónicos. ppm, partes por millón.

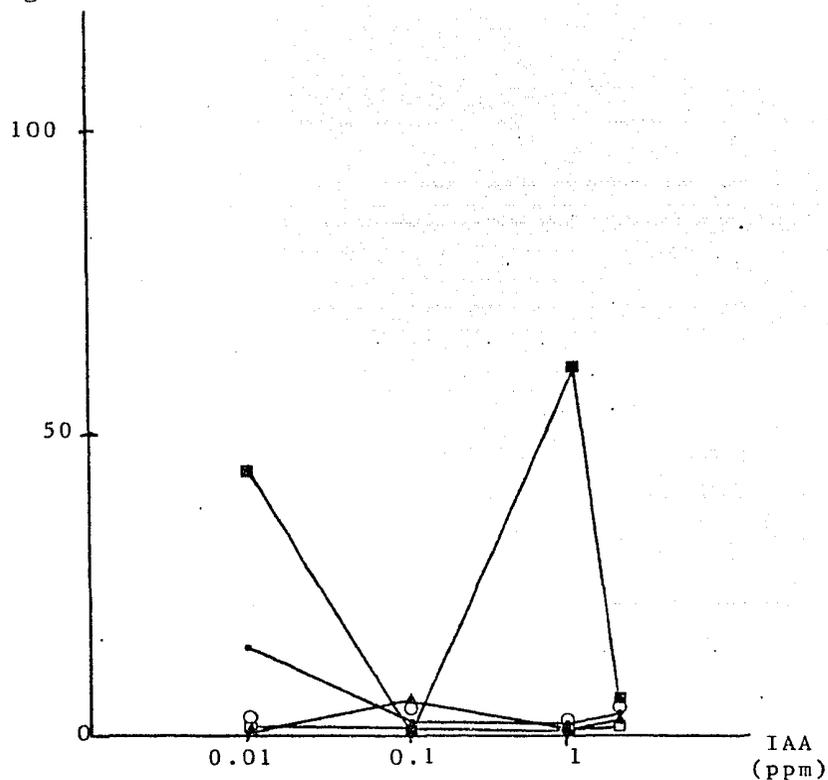
TABLA XXIII

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA DE LOS DATOS DE CONTENIDO
DE CARDIOTONICOS EN CALLOS DE YEMAS DE
SEMILLAS DE T.thevetioides

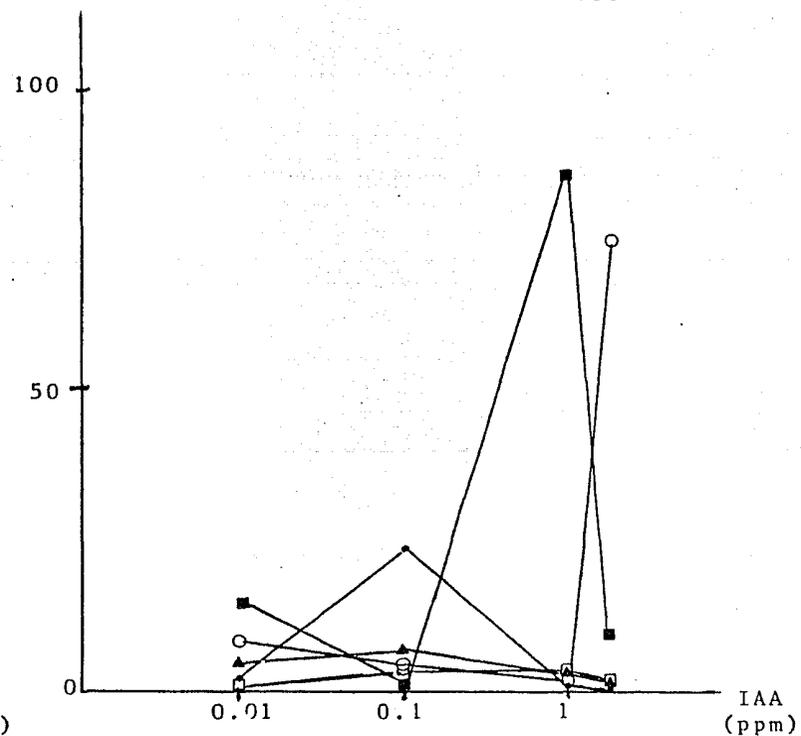
FUENTE DE VARIACION	G.L.	M.C.	F.C.	F.T. _{0.05}
Fotocondiciones	1	193.2427	0.9020	5.12
Accido indolacético (IAA)	3	390.4979	1.8227	3.86
Cinetina (C)	3	1131.5610	5.2819	3.86
Fotocondiciones-IAA	3	197.8337	0.9234	3.86
Fotocondiciones-C	3	158.0173	0.7375	3.86
IAA-C	9	805.3432	3.7591	3.18
Error	9	214.2332		

G.L., grados de libertad; M.C., media de cuadrados; F.C., F calculada; F.T._{0.05} F teórica con un nivel de significancia de 0.05%. Fotocondiciones, luz y oscuridad. Se considera que hay efecto significativo por la fuente de variación cuando la F.C. es mayor que la F.T.

L U Z

 $\frac{\text{mg tev.}}{\text{g de callo.}}$


OBSCURIDAD

 $\frac{\text{mg tev.}}{\text{g de callo.}}$


C (ppm)

- 0.00
- 0.05
- ▲ 0.25
- 1.00
- 1.50

Fig. 25. Contenido de tevetósidos en mg por g de callos frescos obtenidos a partir de yemas de semillas de *T.thevetioides* en función de la concentración de IAA a diferentes concentraciones de cinetina C en luz y obscuridad. ppm partes por millón.

6.- Diferenciación

Estas observaciones se presentan en la tabla XXIV, la que indica que prácticamente no hay diferenciación cuando el explante se ha obtenido con el aparato muestreador diseñado.

En condiciones de luz se encuentra que sólo el tratamiento 14 (tabla IV) presentó una diferenciación del 3.57%, mientras que en obscuridad la presentaron los tratamientos 8, 12, 15 y 20, y en cantidades mayores que en luz.

Comparando la diferenciación presentada por los explantes de tipo circular con la obtenida por yemas (tabla XXV), se observa que los callos producidos por las yemas presentan una mayor diferenciación.

De esta manera, los explantes obtenidos con el aparato muestreador son mejores para la producción de callos que los obtenidos con yemas.

TABLA XXIV
 EFECTO DE LA LUZ Y BALANCE HORMONAL AUXINA/CITOCININA
 (IAA/C) SOBRE EL PORCIENTO DE DIFERENCIACION
 DE CALLOS DE COTILEDON

	Cinetina (ppm)	Acido indolacético (ppm)			
		0.01	0.10	1.00	2.50
L U Z	0.00	0	0	0	0
	0.05	0	0	0	0
	0.25	0	0	0	0
	1.00	0	3.570	0	0
	1.50	0	0	0	0
O B S C U R I D A D	0.00	0	0	0	3.570
	0.05	0	0	0	3.570
	0.25	0	0	7.140	0
	1.00	0	0	7.14	0
	1.50	0	0	0	7.140

Las observaciones se realizan cada dos semanas cuando se va a muestrear. Todos los cultivos expuestos a la luz - presentan pigmentación verde que cambia a café rojiza con el tiempo. Los cultivos de obscuridad tambien toman pigmentación café rojiza con el tiempo. La diferenciación se manifiesta como raíces, hojas y/o brotes.

TABLA XXV
 EFECTO DE LA LUZ Y BALANCE HORMONAL AUXINA/CITOCININA
 (IAA/C) SOBRE EL PORCIENTO DE DIFERENCIACION
 DE CALLOS DE YEMAS

	Cinetina (ppm)	Acido indolacético(ppm)			
		0.01	0.10	1.00	2.50
L U Z	0.00	57	0	57	42
	0.05	42	14	14	0
	0.25	14	0	57	14
	1.00	28	14	28	0
	1.50	0	28	0	0
O B S C U R I D A D	0.00	57	0	57	14
	0.05	42	0	85	14
	0.25	28	0	42	0
	1.00	0	28	28	0
	1.50	0	42	0	14

Las observaciones se realizan a las seis semanas de in cubación y la diferenciación se puede manifestar con la pre sencia de raíces, brotes y/o hojas. Todos los cultivos ex puestos a la luz presentan pigmentación verde, que cambia a café rojiza con el tiempo. Los callos de obscuridad tambien toman coloración café rojiza con el tiempo. ppm, concentra ción en partes por millón.

7.6 Resumen de resultados

En la tabla XXVI se encuentran resumidas las condiciones de cultivo que los resultados con cada variable de respuesta indican que son las más adecuadas para la inducción y mantenimiento de callos a partir de semillas de T.thevetioides. Para determinar cuales de ellas serán finalmente seleccionadas como las mejores de las probadas, es necesario confrontar los resultados encontrados con cada una de las variables de respuesta.

Con este fin, se observa que el peso fresco no se ve afectado por las condiciones de luz, mientras el peso seco es fuertemente afectado por este factor en la medida en que la concentración de cinetina necesaria para la mayor producción de peso seco es diferente en luz y oscuridad.

Observando la curva de crecimiento de los cultivos y usando el peso seco como variable de respuesta (fig. 26), se ve que en luz, la línea de 1 ppm de C presenta una fase lag muy corta, alcanzando su máximo crecimiento a las cuatro semanas además de ser mayor que el presentado por las otras curvas. Por otra parte, en oscuridad la curva que representa 1.5 ppm de C tiene una --- fase lag muy prolongada (2 semanas) y que su máximo de crecimiento es hasta las seis semanas siendo este más bajo que el presentado por la curva de 1 ppm de C, el cual se consigue a las cuatro semanas.

De lo anterior se deduce que la mayor producción de masa celular seca se produce con 1 ppm de C y 2.5 ppm de IAA, alcanzando el máximo de crecimiento a las cuatro semanas, tanto en luz como en oscuridad.

Considerando ahora el peso fresco, las curvas de crecimiento trazadas con esta variable de respuesta, al compararlas con las

TABLA XXVI
CONDICIONES MAS ADECUADAS PARA LA INDUCCION Y
MANTENIMIENTO DE CALLOS A PARTIR DE
EXPLANTES DE SEMILLAS DE
T.thevetioides

VARIABLE DE RESPUESTA	EXPLANTE	CONCENTRACION HORMONAL		RELACION IAA/C	FOTOCONDI CIONES
		IAA	C		
I.P.F.	CIRCULAR	2.5	1	2.5	Ly 0
P.S.	CIRCULAR	2.5	1	2.5	L
		2.5	1.5	1.6	0
No.C.	CIRCULAR	2.5	0	-	L
		1	0.05	20	L y 0
FRIABILIDAD	CIRCULAR	2.5	1	2.5	L y 0
C. TEV.	YEMA	1	1.5	0.6	L y 0

IAA, ácido indolacético en mg/l; C, cinetina en mg/l; IAA/C relación hormonal auxina/citocinina; I.P.F., índice de peso fresco; P.S., peso seco; No.C., número de células; C. TEV., contenido de tevetósidos.

L U Z

OBSCURIDAD

IAA C

2.5 0 •

2.5 0.05 ●

2.5 0.25 ▲

2.5 1 □

2.5 1.5 ■

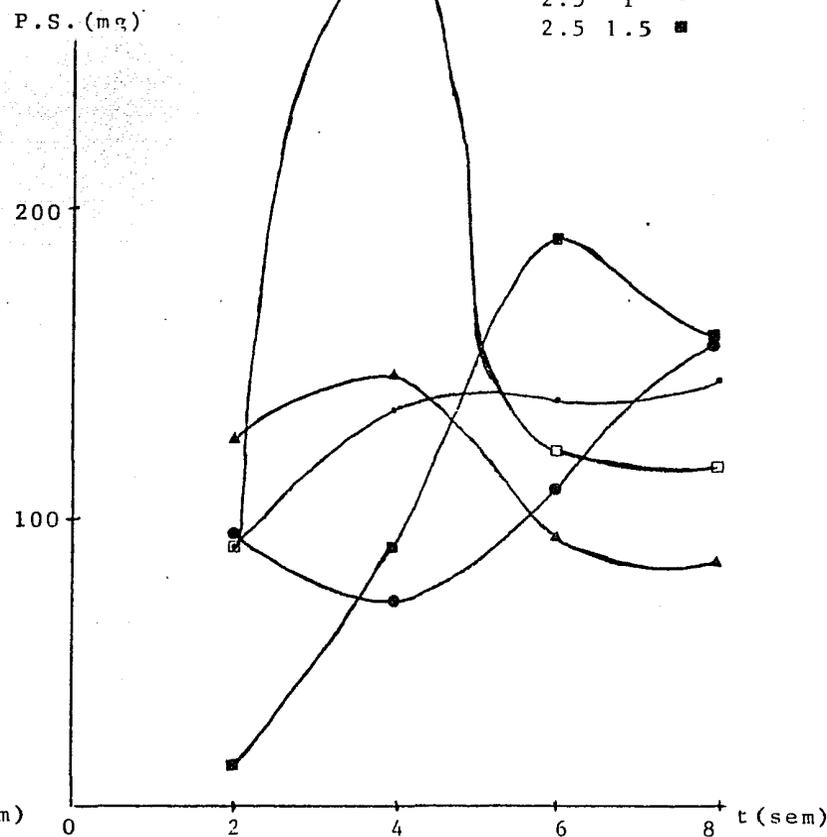
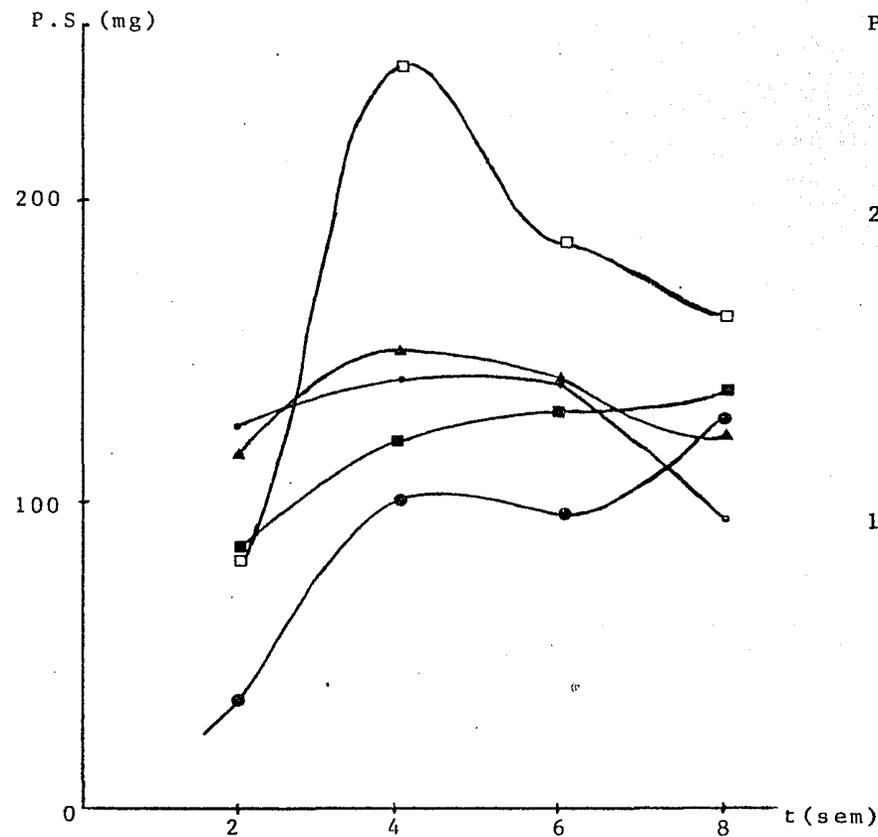


fig. 26. Peso seco (P.S.) en mg, de cultivos de callos de *T. thevetioides*, en función del tiempo de incubación y a diferentes concentraciones de ácido indolacético y cinetina (IAA y C respectivamente).

obtenidas con el peso seco, muestran que a las cuatro semanas se alcanza la máxima producción de biomasa húmeda (fig, 27), y que - después de este tiempo ocurre una hidratación o transporte rápido de nutrientes hacia el interior de las células, de manera que se obtiene una curva exponencial. Esto indica que la curva de peso seco expone realmente que la división celular comienza en la primera y segunda semana de incubación, alcanzando el máximo desarrollo a las cuatro semanas, después de las cuales se presenta un rápido descenso en la biomasa, debido probablemente a hidrólisis celular.

Lo mencionado anteriormente se explica mediante las observaciones del tamaño y forma celulares que se realizaron a las cuatro y ocho semanas, según las cuales indican que a las cuatro semanas los cultivos contienen una gran cantidad de células muy pequeñas, del tipo meristemático, mientras a las ocho, las células predominantes son de mayor tamaño y formas definidas.

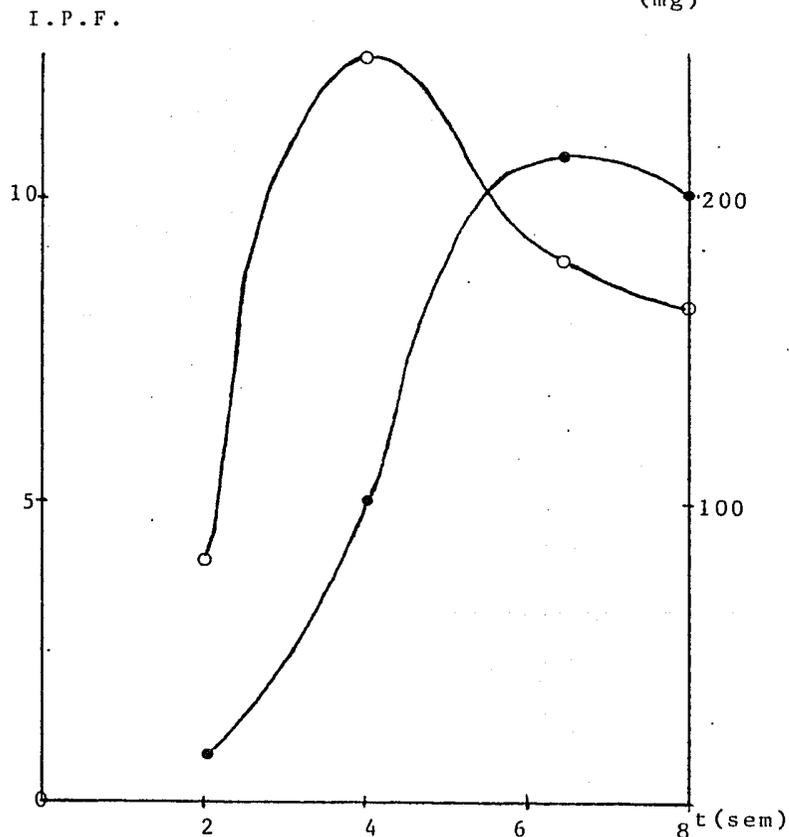
Otro apoyo para afirmar que la división celular se efectúa entre la primera y cuarta semana de incubación lo aportan las - curvas de crecimiento trazadas con el número de células (fig 28), quienes muestran que al igual que sucede para el peso seco, que el máximo de crecimiento se obtiene a las cuatro semanas de cultivo, presencándose posteriormente un rápido descenso de la curva tanto en luz como en obscuridad.

De todo lo anterior se deduce que la producción celular es mayor cuando la concentración de IAA es mayor que la de C, es decir, cuando la relación hormonal IAA/C es mayor de uno. Esto concuerda perfectamente con las variables de respuesta de peso seco y peso fresco aunque menos exactamente con el número de células, pero como se mencionó anteriormente, la última variable no resul

L U Z

● I.P.F.
○ P.S.

P.S.
(mg)



OBSCURIDAD

● I.P.F.
○ P.S.

P.S.
(mg)

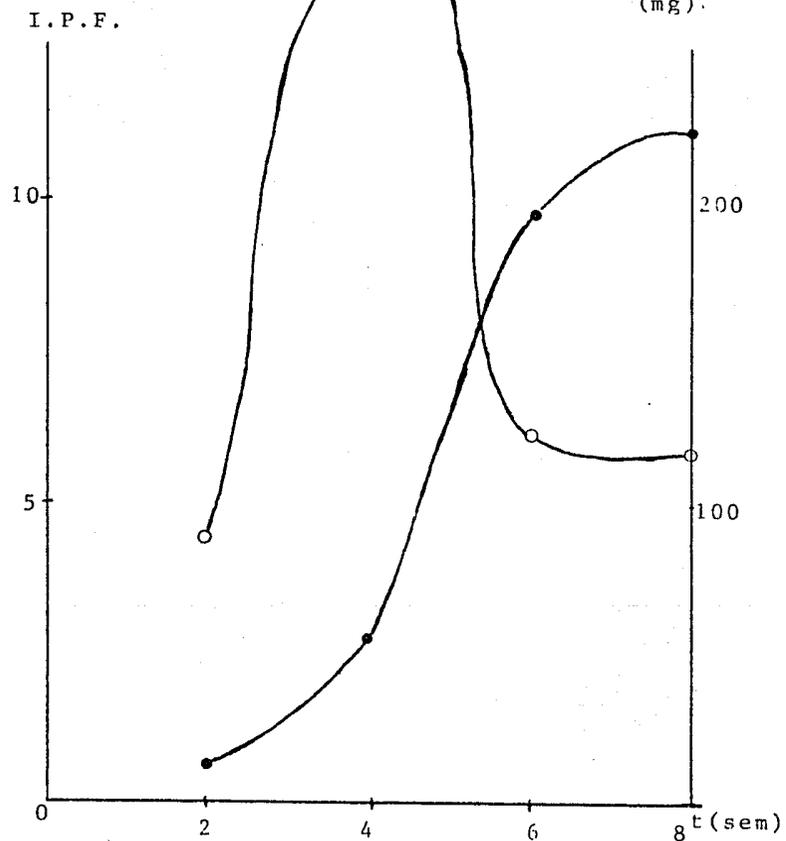


fig. 27. Curvas de crecimiento de callos de T.thevetioides crecidos en luz y obs-
curidad y con 2.5 ppm de IAA y 1 ppm de C. P.S., peso seco en mg; I.P.F., índice
de peso fresco.

LUZ

OBSCURIDAD

IAA (ppm)	C (ppm)
● 2.5	0
○ 1	0.05
▲ 2.5	1

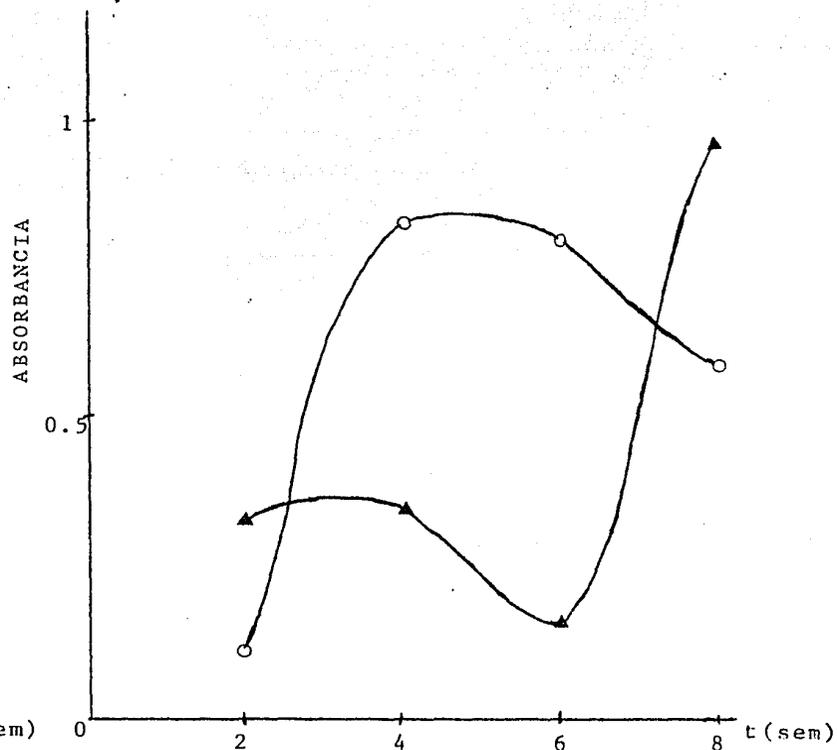
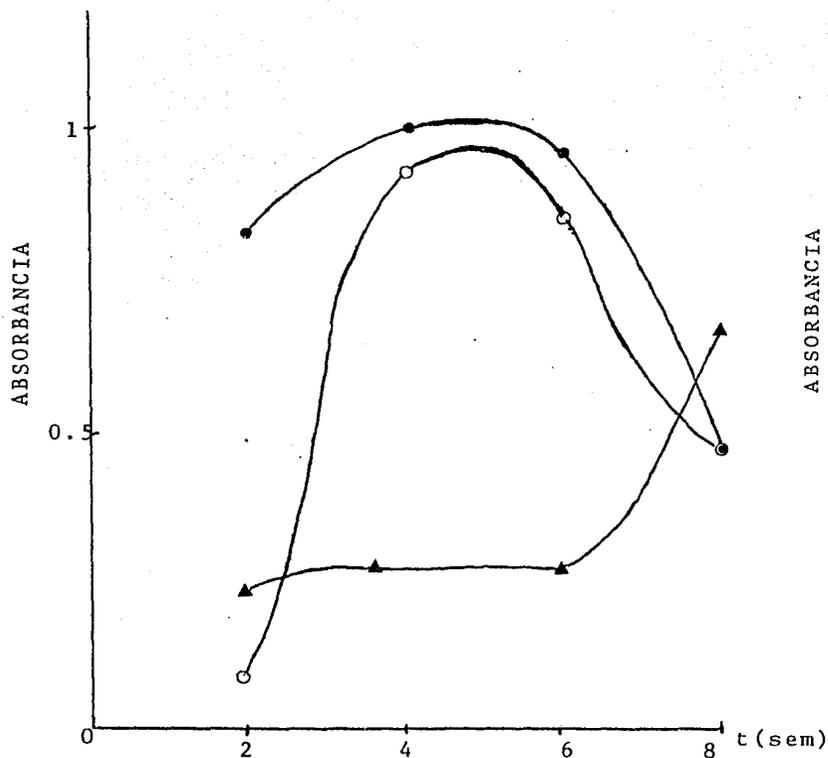


Fig 28. Curvas de crecimiento comparativas utilizando el No. C. (en absorbancia) a diferentes concentraciones de IAA y C. ppm, partes por millón.

tó ser un parámetro de medición conveniente para el desarrollo de los cultivos.

Se debe aceptar entonces que para saber cuando los cultivos se pueden resebrar, ya sea en medio sólido o en medio líquido, se deben de considerar el peso fresco y el peso seco juntos y no solamente uno de ellos.

En este caso las resiembras se deben realizar a las 5-6 semanas de incubación, ya que en este tiempo se asegura que el inóculo contendrá suficiente cantidad de células meristemáticas para el éxito del nuevo cultivo, ya sea en medio líquido o semisólido.

Si el cultivo se desea pasar a medio líquido, que es el caso de este trabajo, se debe tomar en consideración la cantidad de masa celular que se pueda liberar del callo por agitación moderada. Este criterio lo da el porcentaje de friabilidad celular. En este trabajo se determinó que con 2.5 ppm de IAA y 1 ppm de C se obtienen callos con mayor friabilidad, tanto en luz como en oscuridad.

Con respecto al contenido de tevetósidos se encontró que -- las concentraciones hormonales más adecuadas son de 1 ppm de IAA y 1.5 ppm de C tanto en luz como en oscuridad. En este caso, a diferencia de lo que pasó con las otras variables de respuesta, la relación hormonal es menor que uno, siendo de esta manera mayor la concentración de C que la de IAA. Esto se debe probablemente a las necesidades hormonales que presentan las células para la producción de los cardiotónicos.

8. CONCLUSIONES

1) Se encontró que no hay efecto significativo respecto a las condiciones de luz y balance hormonal IAA/C sobre la inducción y mantenimiento del tejido calloso.

2) La luz no produce efecto significativo sobre la cinética de crecimiento del tejido calloso mientras que el balance hormonal IAA/C sí lo produce. Se encontró que las condiciones de cultivo más adecuadas se consiguen con 2.5 ppm de IAA y 1 ppm de C tanto en luz como en obscuridad.

3) De los estudios de friabilidad celular se determinó que las mismas condiciones de cultivo mencionadas anteriormente son adecuadas para llevar el cultivo a suspensión.

4) El peso seco y el peso fresco son las variables de respuesta más adecuadas para la interpretación del crecimiento del cultivo de callos y ambas son complementarias una de la otra ya que, la primera indica el periodo de división celular y la segunda el transporte de nutrientes al interior de la célula.

5) Respecto a la producción de cardiotónicos se encontró que tanto en los callos obtenidos a partir de yemas como en los de cotiledón hay presencia de cardiotónicos.

El contenido de cardiotónicos presente en callos obtenidos a partir de yemas y de ocho semanas de edad, es afectado por el balance hormonal IAA/C. Las concentraciones más adecuadas de estas substancias son: 1 ppm de IAA y 1,5 ppm de C tanto en luz como en obscuridad.

De esta forma se han encontrado las condiciones de cultivo adecuadas para la inducción y mantenimiento de callos de T.thevecioides, por medio de cultivo de células vegetales, útiles para la producción de cardiotónicos y factibles de crecer en medios de cultivo líquidos, con lo que se cumplen los objetivos iniciales del trabajo y se acepta la hipótesis propuesta inicialmente.

9. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

1) Evaluar el efecto de la auxina 2,4-D(ácido 2,4-diclorofenoxiacético) sobre la inducción y mantenimiento de los callos de T. thevetioides.

2) Con las mejores concentraciones hormonales encontradas, - llevar los callos a cultivos en suspensión y evaluar el crecimiento celular y producción de cardiotónicos. Esto permitirá establecer un bioreactor vegetal para realizar estudios de biotransformación y/o acumulación de cardiotónicos.

3) De las concentraciones hormonales que ofrecieron mejor -- respuesta, seleccionar un intervalo más estrecho y evaluar nuevamente el efecto de la relación hormonal para encontrar condiciones de cultivo más cercanas a las óptimas.

4) Evaluar el contenido de cardiotónicos con respecto al -- tiempo en callos obtenidos a partir de yemas y de explantes cilíndricos.

10. BIBLIOGRAFIA

- (1) Goodma, L.S. y Gilman, A. "Bases Farmacológicas de la Terapéutica" 4^aEd., Ed. Interamericana, México (1978), 551-575.
- (2) Dorvaul, Pontes.(Botica) "La Oficina de Farmacia" ó "Repertorio Univerzal de Faramcia Práctica", 3^a Ed. Ed. Bailly-Baillie re" re" e Hijos., Madrid España(1905), I, 478-480.
- (3) Kerliger, N., "Investigación del Comportamiento" Tácticas y Metodología. 2^a Ed. Ed. Interamericana, México(1983), 422-487.
- (4) Martínez M., "Las Plantas Medicinales de México" Imprenta Aztecas, México (1969) 73-76.
- (5) Martínez M., y E. Matuda. "Flora del Estado de México" Edición Fascimilier., Biblioteca Enciclopédica del Estado de México., Fasciculos de(1953-72). México.,(1953-72), I y III, 359-504.
- (6) Stanley P., "The trees & Surbs of Mexico" Contr., U.S. National Herbarium. Reimpresión por Otto Koeltz, en 1982.,(1920-1926) part. 4, 1151-1153(1982).
- (7) Medrano Pérez M., "Síntesis de Cardiotónicos Modificados" Tesis para obtener el título de Q.F.B., E.N.E.P. Zaragoza, UNAM México D.F., (1982).
- (8) Cruz, I. García J. Iriarte., J.P. Muchowsky e I. Regla., J. - Org. Chem., 42, 3580,(1977).
- (9) Rodríguez R., "Obtención de Diosgenina de Semillas de Tevetia" Tesis para Obtener el Título de Q.F.B. E.N.E.P. Zaragoza, UNAM México(1982).
- (10)N. Danieli, Mazur y F. Sondehimer., J. Amer. Chem. Soc., 84, - 875(1962).
- (11)Engel Ch. R., Steroids Cols., 3, 593(1964).
- (12)Okada M, y Saits Y., Steroids., 6, 645(1965).
- (13)Fritsh W., et al., Ann. Chem., 4(1974).
- (14)Kruger G., et. al., Can. J. Chem., 24, 4139-42(1974).
- (15)Valcaui U., Cursi S.R., Inocenti., Martelli P., Fármaco, Ed. Sci., 597, 30(1975).
- (16)Gros E.G. Y Leete E., Chem., Ind.,(London), 3, 698(1963)
- (17)Reinchstein T. y Von Euw J., Helv. Chem. Acta., 47, 711(1964).
- (18)Jacobson Cert. M., Recent Advances in Phytochemistry, 3, 229-47(1970).
- (19)Singh B., y Rastogi R.P., Phytochemistry 9, 315-331(1970).

- (20) Comunicación Personal "Naturally Occurring Steroids" 171-178.
- (21) Veliky I., Sandkvist & S.M. Martin, Biotechnology and Bioengineering, 11, 1247-1254(1969).
- (22) Peinhard E., Alferman A. W., Advances in Biochem. Eng. 16, 49-83(1980).
- (23) Staba John E., "Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals" C.R.C. Press, Inc. Boca Raton., Florida(1980). pp.1-20.
- (24) Radwan & H.K. Mangold., Adv. in Biochem. Eng. 16, 109-131(1980).
- (25) King P.J. Adv. In Biochem. Eng. 18, 1-38(1980).
- (26) Gamborg O.L. Murashige T., Thorpe A.T., & Vasil K.I., In Vitro 12(7), 473-478(1976).
- (27) Murashige T., & F. Skoog. Physiol Plant. 15, 473-497(1962).
- (28) Yeoman Michael M., Int. Rev. Cytol. 29, 383-409(1970).
- (29) Webster J.M. Nature 212, 1472(1966).
- (30) Torrey J.G., Adv. Morphogen. 5, 39(1966).
- (31) Weiler E.W. y Zenk M.H., Phytochem., 15, 1537-45(1976).
- (32) Yanagaw Hiroshi et al., Phytochem. 11, 1893-97(1972).
- (33) Gamborg O.L., In Plant Tissue Culture Methods., Eds., National Research Council of Canada., Saskaton, Sask., 1(1975).
- (34) Laties G.G., Plant. Physiol., 37, 679(1962).
- (35) Bandiera M. & Morpurgo G., Experimentia 26(5), 558-59(1970).
- (36) El-Nil Abo M.M., Hildebrandt, & Evert R.F., In Vitro 12(8), -602-604(1976).
- (37) Einset W, John., Plant Physiol 59, 45-47(1977).
- (38) Krting T., et al., Planta Medica 35, 275-78(1979).
- (39) Hagimori Manabu, Matsumoto T., & Obi Y., Plant Physiol, 69, -653-52(1982).
- (40) Staba J.E. & Lui H.C.J., Planta Medica 41, 90-95(1981).
- (41) Skoog F. & Miller., C.O. Symp. Soc. Exp., Biol., 11, 118(1957).
- (42) Foskot D.E. & Roberts L.W., An. J. Botany 52, 929(1965).
- (43) Martin S.M., Temp, Aer. & pH "Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals" C.R.C. Press Inc. Boca Raton., Florida.(1980) pp. 143.

- (44) Thomas M.D. y Hill G.R. In Photosynthesis in Plants, Frank J. y Lomis W.E. Eds., Iowa State University Press Amos (1949) pp19.
- (45) Berlin M.H. y Zelitch., Plant Physiol 56, 752(1975).
- (46) Logemann H. y Borgmann L., Planta (Berlin)., 121,283(1974).
- (47) Seibert Michael y Kedkade G.P., Environmental Factors A. John Staba Eds., C.R.C. Press I.C. Boca Raton, Florida (1980), pp123.
- (48) Gorlich B., Planta Medica 23, 39(1973).
- (49) Wilson G., Adv. in Biochem. Eng. 16, 1-25(1980).
- (50) Kurz W.G.W. y Constabal F., Adv. In Applied Microbiology 25, -209-239(1979).
- (51) Charney W., Herzog H.L., Microbial Transformations of Steroids., New York London Academic Press(1976).
- (52) Dougall K.D. "Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals", Eds., Staba John E., C.R.C. press, Inc. Boca Raton, Florida(1980), pp. 115-1122.
- (53) Dougall K.D. Opocit., pp. 21-58.
- (54) Staba E. John., J. Pharm. Sci. 51(3), 249-54(1962).
- (55) Staba J. E., y Lambda S.S. Llodyaa 26(1), 29-35(1963).
- (56) Sen Gopa y Datta P.C., Planta Medica 41(4), 415-417(1981).
- (57) Stohos Sidney J., y Staba E.J., J. of Pharm. Sci 54(1), 56-58 (1965).
- (58) Medora R., Kosegarten D.C., et. al., J. Pharm. Sci., 56(4), 540-541(1967).
- (59) Hirotsani Masao y Furry T., Phytochem. 14(12), 2601-6(1975).
- (60) Hirotsani Masao y Furry T., Phytochem. 16, 610-611(1977).
- (61) Helmsold H., Volter W., Rehinarnd E., Planta Med. 33, 185-87(1978).
- (62) Hagimori M., et. al., Plant Cell Physiol 21(8), 1391-404(1980).
- (63) Tisuka H., Naito A., Microbial Transformations of Steroids and alkaloids. University of Tokio Press. Tokio, and University - park Press, State College, Pennsylvania, (1969).
- (64) Buchner S.A., E.J. Staba John. J. Pharma Pharmacol, 16, 733(1964).
- (65) Boletin Médico del I.M.S.S., México., 20(2), 63-68(1978).
- (66) Pilgrim H., Phytochemistry 11, 1725(1972).
- (67) Stohos S.L., H. Rosenberg., Llodia 38, 181(1975).

- (68) Furuya Tsutomu y Kojima Hisashi., 10, 1607-1610(1971).
- (69) Lui H.J.C., y Staba E.J., Phytochem. 18(2), 1913-16(1979).
- (70) Furuya Tsutomu., Kawaguchi K., y Hirotani M., Phytochemistry 12(1)1621-1626(1977).
- (71) Egon Stahl "Thin Layer Cromatography", Springer-Verlog(1969).
- (72) Doller P.C., y Reinhard E. Planta Medica 37(4) 277-288(1979).
- (73) Hirotani M., Furya Tsutomu. Phytochemistry 19,531-34(1980).
- (74) Reinhard E., In Street, H.E.,(Ed)., "Tissue Culture and Plant Science" London(1974),pp. 433.
- (75) Rehinhard E., H.M. Boy and F. Kaiser. Planta Med. Suppl., (1975) pp. 163.
- (76) Heins M.J. Wahi H., Lerch F., Keiser and E. Reinhard. Planta Medica 33, 57(1978).
- (77) Veliky J.A., and A. Jones. Abstrac of the 4^o congreso Int. - of Plant Tissue and Cell Culture(Posterpretation 700),(1978) pp. 78.
- (78) Jonas A., I.A. Veliky and R.S., Ozubko. Lloidia 41(5)76(1978).
- (79) Alcántara Pineda Alejandro."Desarrollo de un Método Colorimétrico para Cuantificación de Cardiotónicos" Tesis para obtener el título de Q.F.B. ENEP-Zaragoza, UNAM.(1982).
- (80) Ondarza N. Raúl., "Los Reguladores de las Plantas y los Insectos" Editado por CONACYT, 3^a Ed., México D.F.,(1979), 9-40.