

173
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

EFFECTO MORFOGENETICO DE LA RELACION AUXINA CITOCININA EN EL CULTIVO *in vitro* DE EMBRIONES ZIGOTICOS DE Datura stramonium L.

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ISAAC REYES VERA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE

	Página
RESUMEN.....	1
1.0 INTRODUCCION.....	1
2.0 ANTECEDENTES.....	2
2.1. Origen Geográfico.....	2
2.1.1 Descripción Botánica.....	4
2.1.2 Posición Taxonómica.....	5
2.1.3 Nombres comunes de <u>Datura stramonium</u>	5
2.1.4 Sinónimos de <u>Datura stramonium</u>	6
2.2 Propiedades Medicinales y Terapéuticas del Género <u>Datura</u>	6
2.2.1 El Conocimiento de las Propiedades del Género <u>Datura</u> en el pasado.....	6
2.2.2 El Conocimiento Actual de las Propiedades del Género <u>Datura</u>	9
2.2.3 Principales Usos y Aplicaciones del Género <u>Datura</u>	13
3.0 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.....	17
3.1 Cultivo de Tejidos Vegetales en la Familia Solanaceae.....	30
3.1.1 Cultivo de Tejidos Vegetales en el Género <u>Datura</u>	32
3.1.2 Cultivo de Embriones Zigóticos <u>in vitro</u>	34
3.1.3 Cultivo de Embriones Zigóticos <u>in vitro</u> del Género <u>Datura</u>	51
4.0 OBJETIVOS.....	55
5.0 MATERIALES Y METODOS	56
5.1 Material Biológico.....	56
5.1.1 Esterilización y Disección de Los Explantes....	59
5.2 Método de Siembra.....	66
5.3 Medio de Cultivo.....	68
5.4 Condiciones de Cultivo.....	69
5.5 Diseño Experimental.....	70
5.6 Evaluación de las Variables Dependientes.....	74
5.7 Evaluación Estadística.....	76
6.0 RESULTADOS Y DISCUSION.....	81
7.0 CONCLUSIONES.....	124
8.0 BIBLIOGRAFIA.....	129

ABREVIATURAS EMPLEADAS.

AIA.....	Acido Indol-3-Acético.
BAP.....	6-Bencilaminopurina.
K.....	6 Furfuril Aminopurina.
ANA.....	Acido α -Naftalén-Acético.
CTV.....	Cultivo de Tejidos Vegetales.
MS.....	Medio de Cultivo Murashige & Skoog (1962).
[μ M].....	Concentración Micromolar (1×10^{-6} M.).

RESUMEN.

En el presente trabajo se analizó la respuesta morfogénica de embriones zigóticos de Datura stramonium L. cultivados in vitro.

El medio básico fue el propuesto por Murashige y Skoog, (1962) y fue suplementado con las auxinas AIA y ANA y las citocininas BA y K para inducir la morfogénesis. Se utilizaron las concentraciones 0.0, 0.1, 1.0 y 10.0 micromolar [μM].

Se hicieron 4 experimentos bifactoriales completos, utilizando una auxina con una citocinina en todos sus posibles combinaciones entre los cuatro niveles (concentraciones) de cada hormona. Cada barrido hormonal constó de 16 tratamientos con 8 repeticiones por tratamiento (128 unidades experimentales por barrido hormonal). Los parámetros evaluados fueron: Producción de callo (Peso Seco y Peso Fresco) (grs.), Número de Raíces y Número de Brotes.

Los reguladores de crecimiento que resultaron determinantes para la callogénesis (Evaluada como Peso Seco y Peso Fresco) fueron las auxinas en sus dosis más altas 1.0 y 10.0 [μM], pero especialmente la auxina ANA que tuvo un efecto callogénico más significativo que la auxina AIA. La citocinina más callogénica fue BA en sus concentraciones 1.0 y 10.0 [μM].

La fitohormona que tuvo un mejor efecto rizogénico fue la auxina ANA especialmente en la concentración 1.0 [μM]. La auxina AIA no produjo diferencias significativas debidas al tratamiento al nivel de confianza de 5 % en el análisis de varianza realizado. El efecto de la citocininas en la rizogénesis fue antagónico ya que el incremento en las dosis de las dos citocininas empleadas en combinación con las auxinas inhibió la rizogénesis, los mejores tratamientos para la rizogénesis resultaron aquellos en los que las auxinas actuaron en ausencia de cualquier citocinina.

En cuanto a la caulogénesis, la mejor respuesta observada fue la producida por la citocinina BA en su concentración 10.0 [μM].

La formación de brotes fue generalmente inhibida por las auxinas ya que el incremento en la concentración micromolar de la auxinas tiende a disminuir la caulogénesis, La interacción Auxina/Citocinina fue altamente significativa pero antagónica para la caulogénesis.

1.0 INTRODUCCION

La fase esporofítica de las espermatofitas se inicia con el evento de la polinización seguida de la fertilización lo que invariablemente conduce al desarrollo del cigoto en un embrión. Este embrión se encuentra incluido en el tejido materno durante todo su vida embrionaria y por lo tanto oculto al ojo del investigador. Es claro que el investigador debe frecuentemente interrumpir y suprimir el desarrollo embrionario para conocer algún aspecto del proceso. Esta ineludible manera de proceder ha hecho de la embriología vegetal en muchos casos una ciencia meramente descriptiva.

Actualmente, entre las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* el cultivo de embriones es una herramienta poderosa, que inclusive permite al investigador observar el desarrollo embrionario como un proceso de continuos cambios. Además de ser utilizada para resolver un amplia gama de problemas, ya que usando esta técnica se espera resolver interrogantes tales como: Los requerimientos nutricionales y fisiológicos del desarrollo embrionario y de la germinación, el control de la embriogénesis, efecto de las fitohormonas, utilidad del suspensor, además de numerosas aplicaciones prácticas. Entre las que podemos contar como las más importantes, el uso del cultivo de embriones para vencer la dormancia natural de las semillas.

Sin embargo, la aportación más trascendente del cultivo de embriones zigóticos ha sido el uso de esta técnica para superar la inviabilidad de embriones híbridos de cruza interespecíficas y aún intergenéricas, abriendo con esto las posibilidades de reunir genotipos valiosos de dos especies diferentes en un solo individuo.

En esta investigación se utilizó el cultivo de embriones zigóticos con un propósito rara vez empleado: el uso de estos embriones como fuente de explantes para el estudio de su morfogénesis *in vitro*, para la cual se utilizó el tejido más totipotencial de que se puede disponer, el embrión.

2.0 ANTECEDENTES.

2.1 Origen Geográfico.

La especie Datura stramonium fue descrita por Linneo en 1753, y aunque no se conoce con certeza el significado del epíteto específico stramonium se cree proviene del vocablo latino struma que significa "paperas" (Blanquez 1981), o bien, "hinchado" (Satina y Avery, 1959).

Actualmente D. stramonium tiene una distribución cosmopolita y es indudable que ha acompañado al hombre a través de sus innumerables migraciones por las regiones templadas del mundo desde épocas ancestrales. De manera que esta es seguramente la causa de que actualmente encontremos D. stramonium en los seis continentes, lo cual ha hecho difícil que se unifiquen los criterios de diversos botánicos acerca del origen geográfico de D. stramonium.

Linneo consideró a D. stramonium como originaria de América. Otros botánicos le atribuyen su origen en Sudamérica o Europa. Algunos en cambio hacen a esta especie originaria de Asia. (Satina y Avery, 1959). Al respecto Safford, (1921) le atribuye a D. stramonium su habitat natural en América ya que en el continente europeo nunca se encuentra en estado silvestre mientras que en América su rango de distribución es desde el noreste de América hasta Sudamérica y que fue introducida muy pronto por el hombre a las regiones templadas de Asia, Europa, y Africa. La notable diversidad del género Datura presente en nuestro país ha permitido afirmar que este género tiene su origen geográfico en México y que las especies de Datura se han originado en las zonas

desérticas de lo que ahora es conocida como México, y que los once taxa conocidos que crecen en México diez han sido reconocidos como especies nativas mexicanas (Bye, 1989).

Es importante mencionar que el nombre común de D. stramonium en Japon "yoshu" significa "extranjero" lo cual nos permite suponer que en este lugar es seguramente una especie introducida (Safford, 1921b; Safford, 1922, Citados por Satina y Avery, 1959).

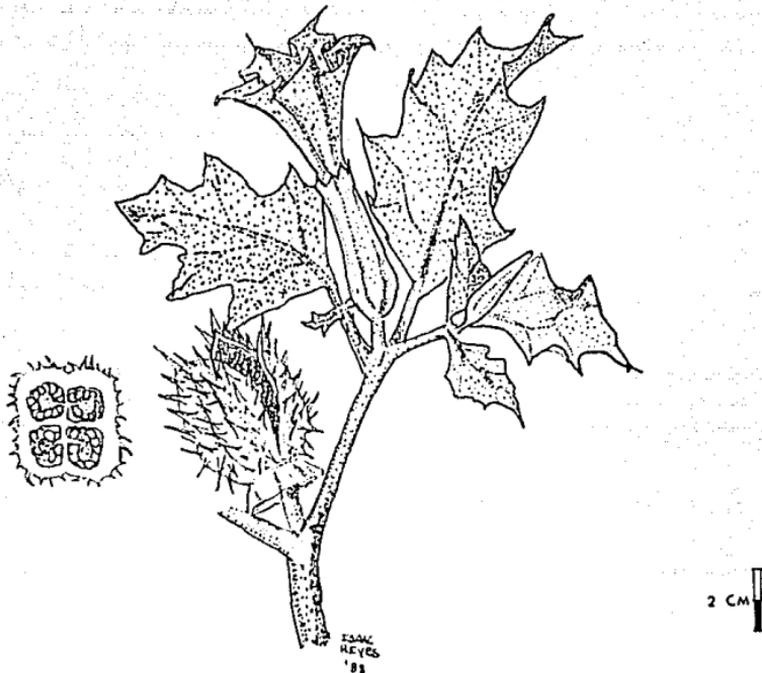


Figura N° 1 Datura stramonium.

2.1.1 Descripción Botánica

Datura stramonium L, Sp. Pl. 1: 179. 1753.

Esta especie pertenece a la sección Stramonium (Scop.) Bernh. Es una planta arbustiva herbácea, robusta, y ramosa, de 30-70 cm de altura, hermafrodita, anual, finamente pubescente cuando joven y glabra en estado adulto. Raíz axonomorfa. Hojas simples, enteras, alternas, largamente pecioladas de 5-15 cm de largo, con limbos ovales, inequiláteros, puntiagudos, base cuneada u obtusa. Flores perfectas; actinomorfas; cáliz gamosépalo, tubiforme cinco lobado en el ápice de 3-4 cm de longitud; corola simpétala blanca o purpúrea pálida, infundibuliforme, de 5-7 cm de longitud, 3-4 cm de diámetro; estambres 5, epipétalos, introrosos, de anteras purpúreas en las plantas con flores purpúreas y blancas en las plantas con flores blancas; ovario súpero imperfectamente 4 locular, multiovulado; estilo simple más corto que la corola con estigma bilamelado. Fruto erecto capsular cuatro valvado, pericárpio armado con espinas fuertes y desiguales. Semillas discoideas, comprimidas, imperfectamente reniformes, negras con embrión periférico, endospermo amiláceo, de placentación central; Número cromosómico ($2n=24$). Florece de julio a agosto. Distribución cosmopolita. (Matuda, 1952; Satina, y Avery, 1959; Schultes, 1982b.).

2.1.2 Posición Taxonómica.

REINO.....	Vegetal
DIVISION.....	Magnoliophyta
CLASE.....	Magnoliopsida
SUBCLASE.....	Asteridae
ORDEN.....	Solanales
FAMILIA.....	Solanaceae
GENERO.....	<u>Datura</u> L. (1737)
ESPECIE.....	<u>D. stramonium</u> L. (1753)

Fuente: Cronquist A. 1981.

2.1.3 Nombres Comunes de Datura stramonium

Origen del Nombre	Nombre Común	Referencia.
India Oriental	Dutra. Dhatura.	(Satina, 1959)
Inglés	Downy Thorn Apple. Thorn Apple. Stink Weed. Raving Night Shade. Jimson Weed.	(Satina, 1959)
Francés	Pomme épineuse. Pomme de Diable. Herbe aux Sorciers.	(Madueño, 1973)
Alemán	Dornapfel.	(Satina, 1959)
Holandés	Doornappel.	(Satina, 1959)
Japonés	Yoshu.	(Satina, 1959)
Nahuatl (México)	Tolohuaxihuitl. Tlapatl. Toloache. Nacazul.	(De la Cruz-Badiano, 1964) (Sahagún, 1938) (Sahagún, 1938) (Díaz, 1979)
Huichol (México)	Kieli-sa.	(Díaz, 1979)
Italiano	Noce Puzza. Noce Spinosa. Mezzetoni.	(Madueño, 1973)
Español	Higuera del Infierno Estramonium. Hierba Hedionda.	(Madueño, 1973)

Tabla Nº 1. Nombres Comunes de Datura stramonium.

2.1.4 Sinónimos de Datura stramonium.

Debido a la extraordinaria variabilidad morfológica que presenta D. stramonium diversos taxónomos han descrito como especies diferentes a muchas de las variantes morfológicas de D. stramonium. Actualmente se conocen más de 20 sinónimos de esta especie, de entre los muchos sinónimos que se conocen los más importantes son:

D. tatula L. (1762)

D. inermis Jacq. (1766)

2.2 Propiedades Medicinales y Terapéuticas del Género Datura

2.2.1 El Conocimiento de las Propiedades del Género Datura en el pasado.

Datura es un género cosmopolita que por sus notables propiedades psicoactivas ha desempeñado un papel importante en la religión, magia, adivinación, brujería, y la medicina tradicional de las más diversas culturas, en varios continentes desde épocas muy remotas. En ambos hemisferios las Daturas y otros géneros relacionados son y han sido usados, como alucinógenos sagrados, como en la medicina nativa y en los ritos mágico-religiosos.

En la cultura china, durante las dinastías Sung y Ming (960-1644 D.C.), las Daturas eran consideradas plantas sagradas, pues según una leyenda taoísta, cuando Buda predicaba, las plantas de Datura eran regadas por un suave rocío que caía del cielo. En la India se han conocido y apreciado sus propiedades desde tiempos

inflamaciones del pecho, enfermedades de la piel y diarrea. (Schultes, 1982a).

En la Grecia clásica era un ingrediente fundamental en el ceremonial del oráculo de Delfos. (Armstrong, 1986).

En la Europa medieval, la Datura junto con otras especies solanáceas, que contienen los mismos alcaloides del grupo del tropano, han constituido una parte importante del folklore y la mitología de muchos pueblos europeos (Schultes, 1982b).

En el nuevo mundo como en ningún otro lugar, el género Datura ha gozado de una importancia ceremonial como la que tiene y ha tenido en Mesoamérica. En el suroeste de los Estados Unidos donde los indios que habitaban el sur de California utilizaban a la Datura como un alucinógeno mágico-religioso, en los rituales de iniciación a la virilidad masculina que practicaban las tribus establecidas en los valles de San Joaquín y Sacramento (Furst, 1980).

En la Mesoamérica precolombina, la Datura fue conocida por diferentes nombres como: toluhuaxihuitl (De la Cruz-Badiano, 1964) tlapatl (Sahagún, 1938), pero el principal y que hasta la fecha subsiste es el de toloache que es una voz degenerada de toloatzin (cabeza inclinada) probablemente en alusión a su fruto caído.

*En la edición de Pedro Robredo, de 1969 el tlapatl de Sahagún esta determinada inexplicablemente como Datura stramonium. Sin embargo, la característica del tlapatl descrito por Sahagún es la de tener un fruto en forma de "cabezuela sin espinas, como limones", característica que no guarda D. stramonium. La especie a la cual se refiere Sahagún es seguramente D. ceratocaula.

Cabe mencionar que para la especie D. stramonium existe la forma inermis cuya característica fundamental consiste en presentar una cápsula con el pericarpio desarmado.

Existen documentos como los testimonios de Fray Bernardino de Sahagún, De la Cruz-Badiano y Francisco Hernández entre otros ** que se refieren a las aplicaciones terapéuticas que le daban los Aztecas al toloache, en especial para aliviar los dolores reumáticos, reducir hinchazones, curar el insomnio y el "laterum dolorem" (De la Cruz-Badiano, 1964). Así como para inducir alucinaciones y "borrachera" (Sahagún, 1938).

En México ha persistido el uso del toloache, tanto en ceremonias como elemento magico-religioso y como recurso terapéutico desde épocas remotas hasta nuestros días.

En todas las fuentes históricas que aluden a las Daturas coinciden en mencionar que el abuso de esta planta provoca trastornos mentales irreversibles.

** Fray Juan de Torquemada, también se refiere al tlápatl como una planta medicinal sin embargo, por la descripción botánica que hace del tlápatl, seguramente no se trata de una Datura sino de otra planta completamente diferente, probablemente se trata de Ricinus communis.

2.2.2 El Conocimiento Actual de las Propiedades del Género Datura.

Todas las especies del género Datura junto con numerosas especies de diferentes géneros de la familia Solanaceae, como son Belladona, Hycocyanus, Mandrágora, Solandra, Brugmansia, Brunfelsia, Latua, y Methysticodendron contienen compuestos químicos similares. Sus principios activos son básicamente la hiosciamina, atropina y escopolamina, todos alcaloides del grupo del tropano. (Schultes, 1982b).

Pueden encontrarse en el género Datura alcaloides menores relacionados químicamente como la norescopolamina y la meteloidina, todos con conocidas propiedades narcóticas y medicinales las cuales producen una intoxicación que puede variar dependiendo de la dosis y cuyos síntomas son: malestar general, dilatación de pupilas (midriásis), parálisis de los músculos de acomodación del iris (cyclopegia) sequedad de la boca, hiperemia cutánea (especialmente en la cara), agitación de la respiración, disminución de la temperatura corporal, taquicardia, desordenes en el sistema nervioso (ataxia), rigidez, delirio, alucinaciones y la muerte (Aguilar, 1982).

A dosis elevadas los alcaloides de Datura pueden provocar desvarios temporales y aun demencia permanente (Furst, 1980).

Debido a que las plantas de Datura son unas malezas, frecuentemente son ingeridas por el ganado, o bien incorporadas al forraje involuntariamente, produciendo intoxicaciones cuyos efectos dependen de la cantidad ingerida.

El ganado bovino, ovino, caprino, equino y porcino puede resultar afectado, de estos los menos susceptibles son los cerdos,

caballos y ovinos.

Los bovinos presentan los siguientes signos clínicos: pulso y respiración acelerados, mucha sed, ceguera parcial, orinan frecuentemente (poliuria), o bien padecen retención urinaria, diarrea y dilatación de la pupila. Imposibilitados para el movimiento quedan postrados con el cuerpo rígido. En las etapas finales del envenenamiento, la respiración se hace lenta, débil e irregular y la muerte sobreviene por asfixia, en cerdos la muerte por intoxicación con Datura se caracteriza por convulsiones y contracciones espasmódicas en todo el cuerpo (Mendoza, 1979).

De manera general, los síntomas son de desorden en las funciones del sistema nervioso (ataxia), abundancia excesiva de sangre (hiperemia), incoordinación, coma y muerte. Las lesiones que pueden revelar la necropsia son: edema pulmonar y pelequias en el cerebro. Los usos terapéuticos de Datura también han tenido aplicaciones veterinarias, pues el tolonche se ha usado en el tratamiento para el alivio sintomático de la respiración fatigosa de los caballos (huélfago) (Lara, 1973).

Es importante mencionar que aparte del conocimiento científico que se ha logrado de las propiedades biodinámicas de los alcaloides de Datura existe un refinado conocimiento empírico de los efectos biológicos de estos alcaloides.

Este conocimiento ha sido generado por el continuo uso popular desde tiempos prehispánicos hasta nuestros días en diversos grupos étnicos.

Actualmente se sabe que las mujeres yaquis usan una infusión de Datura para atenuar los sufrimientos de parto (Martínez,

1959). Los tarahumaras actuales adicionan raíces, semillas y hojas de Datura a la cerveza que hacen con maíz (Schultes, 1982b).

Entre los huicholes no es raro que la Datura se consuma mezclada con mezcal o tesguino para aumentar su poder intoxicante (Schultes, 1982a).

El empleo de Datura stramonium para confeccionar cigarrillos con hojas secas, ha sido un remedio popular comunmente usado por sus propiedades antiespasmódicas y antiasmáticas (Aguilar, 1982; Martínez, 1959). Así como también se usan cigarrillos con hojas de Datura mezclado con tabaco y hojas secas de Salvia sp. (García, 1940; Martínez, 1959).

Otra forma notable de utilizarlo es debido a la liposolubilidad de los alcaloides de Datura que les permite ser absorbidos a través de la piel (Armstrong, 1986), propiedad que se aprovecha para preparar un ungüento grasoso elaborado con manteca de cerdo con semillas y hojas secas de Datura que se frota sobre el abdomen para producir alucinaciones visuales (Schultes, 1982a) o bien, se usa como bálsamo tranquilo para su administración en fricciones como calmante contra las neuralgias, con 2.0 g de hojas de Datura en polvo y 60 g de manteca de cerdo o bien en linimento, sustituyendo la manteca de cerdo con 125 g de aceite (García, 1940).

Las Daturas forman parte de un numeroso grupo de plantas autóctonas de uso común en la medicina tradicional actual, que constituyen parte de las plantas medicinales expandidas al público en diversos mercados de todo el país desde el Norte (Chihuahua) hasta el Sur (Mérida) y el Mercado Sonora de la

Ciudad de México. Hoy día, la Datura es una planta comunmente recomendada para el tratamiento de hemorroides, várices, úlceras e inflamaciones en aplicaciones locales en forma de cataplasma o en aspiraciones de la infusión. También la Datura es solicitada para utilizar sus propiedades tóxicas y "hacer maldad" o "trabajos" en este caso debe ser ingerida usandose principalmente las semillas (Bye y Linares, 1987).

2.2.3 Principales Usos y Aplicaciones del Género Datura.

La medicina moderna ha reconocido el valor e importancia de los alcaloides de Datura así como sus usos terapéuticos, de manera que en cualquier farmacopea se puede encontrar enlistada una o varias especies de Datura, resulta notable el hecho de que la farmacopea norteamericana solo haya enlistado a D. stramonium, y excluya a otras especies con igual o mayor potencial farmacológico, así mismo se ha omitido el uso de todas las partes de la planta excepto la hoja, a pesar de que se ha demostrado que otras partes pueden contener cantidades mas altas de alcaloides. Durante la Segunda Guerra Mundial cuando los alcaloides provenientes de Atropa belladonna escaseaban mucho, algunas compañías norteamericanas cultivaron Datura como fuente alternativa de estos alcaloides. La atropina e hioscina afecta al sistema nervioso central, de manera general, la atropina causa una estimulación de este sistema, mientras que que la hioscina actúa como un depresivo, la atropina ha sido usada para contrarrestar el efecto depresivo causado por la morfina. También es útil como antídoto de los altamente tóxicos insecticidas fosfatados como el tetraetilpirofosfato, también funciona como antídoto del dialkilfluorofosfato, conocido como "gas nervioso". La hioscina ha alcanzado alguna notoriedad por su utilización como "suero de la verdad". Además de ser un excelente preventivo para el mareo y se encuentra disponible en tabletas mezclado con un hipnótico como el amital sódico, el cual ha sido reportado como más efectivo que la dramamina o el benadryl. Es usado en obstetricia junto con la morfina como un analgésico para provocar

una narcosis parcial obstétrica, producida para mitigar los dolores del parto. La atropina, hiosciamina, hioscina son los únicos tres alcaloides de Datura que tienen un uso farmacológico considerable, el primero de ellos es usado principalmente en medicina por su propiedad de causar dilatación de la pupila, (midriasis), así como de ciclopegia que es una parálisis de los músculos que acomodan el iris, por esa razón la atropina es empleada de manera extensiva en oftalmología para hacer descansar un ojo inflamado, normalmente es aplicada directamente como una solución acuosa del 1% al 2% de sulfato de atropina. El efecto midriático se inicia después de una hora y media y tiene una duración notablemente prolongado y que puede durar hasta por 10 días. La hioscina tiene el mismo efecto aunque más débil y de menor duración. Esta se emplea en su forma de hidrocloreuro de hioscina en solución de 1% al 2%.

Ligeros cambios en la estereoquímica de los alcaloides tienen un profundo cambio en sus efectos fisiológicos. Así tenemos que solo un isómero de la atropina (l-hiosciamina) tiene propiedades midriáticas, sin embargo ambos isómeros parecen tener el mismo efecto en el sistema nervioso central. (Leete, 1959).

Actualmente numerosos fármacos de uso común son elaborados con alcaloides que se extraen de Datura los cuales se encuentran enlistados en la siguiente tabla número 2.

TABLA No 2 Fármacos que Emplean Alcaloides Extraídos de Datura.

ALCALOIDE Y FORMA	NOMBRE DEL FARMACO.	EFECTO TERAPEUTICO.
ATROPINA Sulfato de Atropina	Atro Ofteno 1% y 2%. Atropina "oculo" Espasmotex	Midriatico, Ciclopéptico, Parasimpaticolítico. Midriático. Antiespasmodico, Sedante, Analgésico
	Gelogen	Anticolinérgico y Antiácido.
	Redotex Tropatil	Anorexígeno. Antidiarréico.
Metil bromuro de Atropina.	Sedo-uromitol	Antiespasmodico y Antiséptico.
ESCOPOLAMINA Bromuro de N-butyl Escopolamina.	Prodolina Compositum	Antiespasmodico y Analgésico.
Metilnitrato de Escopolamina	Vioftalil	Amebicida.
HIOSCIAMINA Sulfato de Hiosciamina	Donnatal Pediátrico	Antiespasmodico y Sedante.
HIOSCINA N-Butil Bromuro de Hioscina	Buscalide	Antihipersecretor Gástrico y Antiespasmolítico.
	Buscapina	Esmasmolítico
	Buscapina Compositum	Espasmolítico y Analgésico
	Buscopax	Espasmolítico y Sedante.
	Rutilamina	Espasmolítico y antiespasmodico.
	Rutilamina compuesta	Espasmolítico y antiespasmodico.
	Colepren	Antiespasmodico.
	Dolobuscapina	Analgésico y Espasmolítico
	Escapin	Analgésico y Antiespasmodico
	Espasantral	Amebicida y Espasmolítico.

**TABLA No 2 Fármacos que Emplean Alcaloides Extraídos de Datura
(continuación)**

ALCALOIDE Y FORMA	NOMBRE DEL FARMACO.	EFECTO TERAPEUTICO
Propionsulfonio de Hioscina	Retodol Compositum Selpiran Espacil Espacil Compuesto	Espasmolítico y Analgésico. Analgésico y Antiespasmódico. Antiespasmódico. Antiespasmódico y Analgésico.

Fuente: Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 1985,
Ediciones P.L.M., México.

3.0 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El término Cultivo de Tejidos Vegetales (C.T.V.) es un nombre genérico que se utiliza comunmente para denominar todos los tipos de cultivos asépticos de origen vegetal, por lo que en la actualidad existe una considerable confusión y falta de uniformidad en la denominación de las diferentes técnicas, algunas de las cuales no pueden ser, desde un punto de vista muy restringido, cultivo de tejidos.

Es posible distinguir los siguientes tipos de cultivos asépticos vegetales in vitro:

- i.-) Cultivo aséptico de plantas íntegras.
- ii.-) Cultivo de órganos.
- iii.-) Cultivo de tejidos.
- iv.-) Cultivo de células.

Los fundamentos teóricos del C.T.V. surgen de la teoría celular, propuesta de manera simultánea por el botánico Schleiden en 1838 y por el zoólogo Schwan en 1839, donde se afirma que las partes elementales que constituyen a un organismo (células) son semejantes entre sí y tienen la potencialidad de ser individualizadas y continuar creciendo independientemente, hasta generar otro individuo idéntico, con la misma información genética, si se le proporcionan las condiciones externas adecuadas (Dodds y Roberts, 1982).

A finales del siglo XIX surgieron las primeras especulaciones con Rechinger en 1893 quien observó formación de callo en fragmentos de tallo y secciones de raíces, (Dodds y Roberts, 1982) estos ensayos se llevaron a cabo con fragmentos de tejidos aislados de plantas superiores, sobre arena humedecida, sin

solución nutritiva alguna. Su desarrollo no progreso más allá de la formación de un pequeño callo. Con esto esperaba encontrar "los límites mínimos de divisibilidad en plantas". Reehinger llegó a la conclusión de que secciones más delgadas de 1.5 mm. podrían llegar a desarrollarse. (Gautheret, 1982).

Fue hasta 1902 cuando Haberland intentó cultivar células vegetales aisladas in vitro sobre un medio nutritivo de cultivo de formulación conocida, su propósito era verificar la teoría celular de Schwann, para esto se sirvió de células parenquimáticas aisladas de mesófilo de Eritrhopium sp., Ornitogalum sp., Tradescantia sp. y como nutrientes utilizó la solución de Knop, sacarosa, asparagina y peptona. Las células permanecieron vivas después de 27 días e incrementaron hasta 11 veces su tamaño original, sin embargo no se observó división celular, esto debido seguramente a que Haberland empleó una solución nutritiva muy simple, además de que seleccionó para sus experimentos plantas monocotiledoneas que aún ahora son difíciles de cultivar satisfactoriamente, esto aunado a que utilizó células procedentes del mesófilo con un alto grado de diferenciación y que sus experimentos fueron realizados 31 años antes de que se conocieran los efectos fisiológicos del ácido indolacético (IAA) aunque este compuesto había sido aislado ya por el químico Salkowski en 1883. (Gautheret, 1982; Dodds y Roberts, 1982; Navarro, 1987).

El primer éxito en conseguir y establecer un cultivo continuo de órganos vegetales in vitro fue alcanzado por White en 1934 quien logró demostrar el crecimiento potencial ilimitado de

ápices de raíces aisladas de jitomate Lycopersicon esculentum. White utilizó para sus experimentos un medio líquido formulado con : sales inorgánicas, extracto de levadura y sacarosa. Posteriormente demostró que el extracto de levadura podía ser sustituido por tres vitaminas del grupo B: Tiamina, Piridoxina y Niacina. (Navarro, 1987).

Algunos años después del notable trabajo de White, Nobécourt en 1937 obtuvo proliferación celular de un cultivo in vitro de cambium de raíz de zanahoria. Casi de manera simultánea White y Gautheret, describen trabajos similares donde reportan exitosamente el crecimiento ilimitado al utilizar un híbrido interespecífico de Nicotiana y cambium de zanahoria respectivamente. Describiendo el primer cultivo de tejidos vegetales in vitro en sentido estricto. (Gautheret, 1982).

Las técnicas básicas de cultivo de tejidos vegetales descritos en estos trabajos pioneros han permitido el establecimiento de este tipo de cultivos para muchas otras especies, desencadenando con esto el desarrollo de técnicas altamente sofisticadas y especializadas. (Street, 1977; Gautheret, 1982).

EL MEDIO DE CULTIVO.

El desarrollo de medios de cultivo adecuados ha requerido de varias décadas para desarrollarse, aunque el progreso más notable en estas técnicas se han logrado en los últimos veinte años.

De manera general los requerimientos nutricionales básicos de las plantas cultivadas in vitro son muy similares a las que utilizan las plantas intactas in vivo, sin embargo los medios nutritivos de cultivo deben ser diseñados para propósitos y

requerimientos específicos, no solo en su composición nutricional y hormonal sino también pueden variar en su estado físico, de manera que podemos plantear un sistema de crecimiento *in vitro* en medio sólido o bien en medio líquido.

Los medios nutritivos que se han diseñado para los cultivos asépticos vegetales son muy variados en su composición así como en el objetivo particular para el cual fueron creados. Los medios de Murashige y Skoog (1962) y el formulado por Linsmaier y Skoog (1965), además del B5 diseñado por Gamborg (1968) son los más ampliamente utilizados.

El medio MS es especialmente útil en particular si el objeto de nuestro trabajo es la regeneración vegetal.

El desarrollo de estos medios ha mostrado que no solo es necesario la presencia de los nutrientes necesarios para el mejor desarrollo de los tejidos sino que también las concentraciones relativas de estas son de vital importancia (Gamborg, 1984).

El medio B5 y todas sus variaciones fueron originalmente diseñadas para cultivos en suspensión. existen diferencias notables entre las formulaciones de los medio MS. y B5, la diferencia mas significativa es la mas alta concentración de amonio presente en el medio MS respecto al B5, además de que las vitaminas utilizadas en el medio B5 son 100% mas elevadas que en el medio MS.

Chu en 1978 desarrolló el medio denominado N6 para cultivar anteras de cereales, aunque actualmente es empleado con éxito en cultivo diferentes tipos de cereales.

El medio E1 (Gamborg et al., 1984) permite el rápido

crecimiento de células para embriogénesis y para el crecimiento de protoplastos. (Gamborg, 1984).

Los diversos constituyentes del medio se pueden clasificar en:

- i) Nutrimientos Inorgánicos.
 - Macronutrimientos.
 - Micronutrimientos.
- ii) Compuestos Orgánicos.
 - Carbohidratos.
 - Vitaminas.
 - Aminoácidos.
- iii) Suplementos Complejos.
- iv) Reguladores del Crecimiento.
 - Auxinas.
 - Citocininas.
- v) Materiales Inertes de Soporte.

i) Nutrimientos Inorgánicos.

Aunados al Carbono, Hidrógeno y Oxígeno, los tejidos vegetales requieren de una constante fuente de ciertos nutrientes inorgánicos. Los nutrientes inorgánicos utilizados en las fórmulas de los medios de cultivo, proporcionan los minerales que son considerados como esenciales para hacer posible que se cumplan las funciones vitales en los tejidos en cultivo. para esto se ha tomado en cuenta el criterio de esencialidad de algún elemento, este criterio fue determinado por Arnon (citado por Rojas, 1979). Para que un elemento sea considerado como esencial es necesario demostrar que: a) La planta no puede completar su ciclo vital de manera normal en

ausencia del elemento; b) El elemento sea específico, es decir que no puede ser sustituido por algún otro en su acción fisiológica.

Los elementos requeridos en relativamente grandes cantidades son denominados macronutrientes de estos el que es requerido en mayores cantidades es el nitrógeno este puede ser proporcionado en forma orgánica e inorgánica, de manera orgánica puede ser incorporado al medio en forma de aminoácidos, mientras que en su forma inorgánica puede ser empleado en sus modalidades de de iones amonio y nitrato siendo los iones amonio más rápidamente asimilable por los tejidos. (Gamborg, 1984). De manera general las formulaciones de los medios de cultivo intentan proporcionar a los tejidos en cultivo los minerales en su forma más asimilable.

El Sodio aunque no es generalmente utilizado por las plantas superiores, puede ser considerado como esencial en cultivos in vitro de halófitas, o de plantas con rutas fotosintéticas C4 y plantas con metabolismo ácido de las crasuláceas (M.A.C.) y aunque es esencial puede ser sustituido parcialmente por el Estroncio (Rojas, 1979).

Además de los macronutrientes, las células vegetales requieren de trazas de ciertos elementos menores llamados microelementos, estos son requeridos por todas las plantas superiores y son: Cobre, Zinc, Manganeso, Hierro, Boro, Molibdeno.

La posible esencialidad del Niquel, Berilio y Aluminio aún esta siendo cuestionado (Dodds y Roberts, 1982) este último puede ser importante, empleado en trazas, pero en cantidades

importantes es tóxico (Rojas, 1979).

ii) Compuestos Orgánicos.

Estos compuestos podemos clasificarlos en Tres grupos diferentes: Carbohidratos, Vitaminas y Aminoácidos.

Carbohidratos.

Sin excepción alguna, los cultivos *in vitro* utilizan Glucosa y Sacarosa, y casi todos los cultivos parecen tener su óptimo crecimiento en la presencia del disacárido Sacarosa. La superioridad de la Sacarosa, sobre la la Glucosa, es debido a la naturaleza intrínseca del disacárido y no a sus impurezas, ya que la recristalización no reduce sus efectos. La actividad fisiológica de la Sacarosa en el crecimiento de los tejidos, comparada con la actividad fisiológica de la Glucosa no se restringe a algún ejemplo particular sino que existen muchos otros ejemplos de tales diferencias (White, 1942, citado por Van Overbeek, 1944).

La Glucosa una vez incorporada al medio es rápidamente convertida en los monosacáridos D-Glucosa y D-Fructosa, La glucosa es directamente incorporada al ciclo metabólico de la glucólisis, seguido por la Fructosa.

A decir de algunos autores (Ball, 1953, citado por Dodds y Roberts, 1982) pueden obtenerse resultados muy diferentes si se emplea sacarosa autoclaveada en el medio comparada con otro medio al cual se han agregado sacarosa esterilizada por filtración.

Ocasionalmente se emplea la Glucosa en cultivos de monocotiledóneas, así como la fructosa y el almidón para otras especies (Merino, 1987).

Vitaminas.

Las células vegetales en cultivo tienen requerimientos esenciales de tiamina; las otras vitaminas aunque no son esenciales han mostrado ser útiles en estimular procesos de crecimiento específicos, tal es el caso del cultivo de raíces, para el cual es esencial la adición de tres vitaminas del grupo B: tiamina, piridoxina y niacina (Merino, 1987).

Los medios para cultivos de protoplastos contienen una mezcla de mas vitaminas esenciales (Gamborg, 1982).

Las vitaminas resultan ser esenciales para las células en cultivo porque desempeñan funciones catalíticas en sistemas enzimáticos y son requeridos en cantidades traza (Dodds y Roberts, 1982).

Aminoácidos.

Las células vegetales en cultivo normalmente son capaces de sintetizar todos los aminoácidos requeridos, la adición de l-Glutamina o mezcla de varios aminoácidos es frecuentemente benéfico (Gamborg, 1984).

Diferentes medios de cultivo coinciden al incluir a la Glicina (ácido aminoacético) como único aminoácido constituyente del medio.

Cuando alguna mezcla de aminoácidos es considerada como necesaria, el medio puede ser enriquecido con hidrolizado de caseína que consiste en una mezcla compleja de al menos 18 aminoácidos, un aminoácido puede ser necesario para inducir alguna respuesta fisiológica específica (Dodds y Roberts, 1982) una vez obtenido algún efecto positivo puede ser investigado por la adición posterior de una mezcla de aminoácidos en lugar del

hidrolizado, así, algún aminoácido específico puede ser detectado por un proceso de eliminación.

iii) Suplementos Complejos.

Frecuentemente se utilizan los extractos complejos de origen natural como una alternativa después de que todos los ingredientes definidos del medio de cultivo han fallado en la búsqueda de algún efecto deseado.

Ejemplos de estos suplementos complejos son los siguientes:

- Pulpa de plátano.
- Agua de Coco.
- Emulsión de Pescado.
- Extracto de Malta.
- Extracto de Levadura.
- Hidrolizados proteicos.
- Jugos de Fruta.

Las grandes desventajas que existen en el empleo de los suplementos complejos consiste en que debido a la gran diversidad de compuestos que constituyen a los extractos naturales, una vez obtenido el efecto buscado, sería muy difícil que mediante un proceso de eliminación se determine el compuesto o grupo de ellos que son la causa de el efecto producido.

La otra desventaja importante que se deriva del empleo de suplementos complejos es intrínseca a la natural variación en la fuente del extracto natural debido al estado fisiológico, tamaño, madurez, estado de conservación y variaciones naturales propias de los organismos. Por lo que el empleo de los suplementos complejos puede conducir a resultados irreproducibles, de manera

que actualmente se prefiere el uso de medios de cultivo de composición químicamente conocida.

iv) Reguladores del Crecimiento.

Existen dos amplios grupos de reguladores del crecimiento principalmente utilizados en las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, estos son: Auxinas y Citocininas

Auxinas.

A continuación se muestran las auxinas mas ampliamente utilizadas:

- a) Acido 3-indolacético. (AIA)
- b) Acido 3-indolbutírico. (IBA)
- c) Acido 4-Clorofenoxiacético. (CPA)
- d) Acido 2,4-diclorofenoxiacético. (2,4-D)
- e) Acido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (TPC) (Merino, 1987).

Aunque el efecto de las auxinas varia de una especie a otra las auxinas se caracterizan por tener una gama de efectos fisiológicos característicos, los principales son:

- a) Organogénesis. (interactúa con las citocininas)
- b) Estimula la división Celular (interactúa con las citocininas)
- c) Alargamiento Celular
- f) Producción de Etileno.
- f) Dominancia Apical.
- g) Prevención de la Abscisión. (Bidwel, 1979).

Citocininas.

De manera general los efectos fisiológicos principales de las Citocininas son:

- a) División Celular.
- b) Alargamiento Celular.
- c) Organogénesis. (interactua con las auxinas)
- d) Contrarresta el Letargo.
- e) Liberación de la Dominancia Apical.
- f) Prevención de la senescencia. (Bidwel, 1979).

Las Citocininas más empleadas en cultivo de tejidos vegetales son:

- 6
- a) N Bencil aminopurina (BA)
- b) N6 Dimetil alil aminopurina (2iP)
- c) N6 Furfuril aminopurina
- d) N6 (4-hidroxi,3-metil,2-butenil)adenina (Merino, 1987).

Cabe mencionar que los efectos fisiológicos de auxinas y citocininas se incrementan sinérgicamente si se les emplea simultáneamente. Esta observación ha resultado ser la piedra angular de las técnicas de micropropagación y para la regeneración de plantas, ya que la inducción de raíces o brotes puede ser regulado a voluntad por proporciones particulares de auxinas y citocininas, de esta manera, tenemos que proporciones relativas altas de auxina inducen la rizogénesis, mientras que una proporción relativa baja de las mismas hormonas favorece la formación de brotes (Skoog y Miller, 1957). A tal descubrimiento se le ha dado por llamar la "Teoría del Balance Hormonal", y en vista de que no todas las especies responden de la misma manera, para encontrar la combinación hormonal y las proporciones relativas de ellas que produzcan algún efecto morfogénético deseado es necesario determinarlo por ensayo y error.

Esta manera de proceder constituye una parte empírica inseparable de los métodos de los cultivos asépticos vegetales (Street, 1977).

Existen otros grupos de reguladores de crecimiento que no son tan generalmente empleados en las técnicas de cultivo *in vitro*, como la giberelinas que son normalmente usadas en la regeneración vegetal después de que los primordios se han diferenciado.

Otro compuesto que ha probado tener efecto como regulador del crecimiento, es el etileno, cuya biosíntesis se lleva a cabo por las células en cultivo y es inducida por el ácido indolacético (Bidwell, 1979) aunque su papel en las células y órganos en cultivo no es conocida (Gamborg, 1984).

Otro compuesto usado menos frecuentemente es el ácido abacísico (ABA) que se caracteriza por ser un inhibidor del crecimiento y su acción primaria parece ser la de tener una acción antagónica con la giberelina, además de estimular el letargo, induce la abscisión, el cierre de los estomas, controla el desarrollo embrionario, reduciendo la proporción de deformaciones cuando se añadió junto con zeatina y GA₃ en el medio de los cultivos en suspensión de embriones somáticos de Carum carvi sp. (Amirato, 1977, citado por Bidwell, 1979).

V) Materiales Inertes de Soporte.

Para los medios sólidos el soporte inerte más ampliamente utilizado es el agar. este se emplea en el rango de 0.6% al 1.0% (p/v), el agar solidificado provee al medio un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inóculo, sin embargo algunos autores han descrito efectos inhibitorios o estimulantes del

crecimiento, puesto que contiene una amplia variedad de contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos.

Existen otros agentes gelificantes comercialmente disponibles estos son a base de poliacrilamida y poliéster sintético (Dodds y Roberts, 1982; Marino, 1987).

AQUA

El agua empleada para todos los medios de cultivo debe ser agua bidestilada y siempre que sea posible desionizada.

Es indispensable que el último paso de destilación se lleve a cabo utilizando destiladores de cristal o de lo contrario se liberaran iones metálicos al agua disminuyendo notablemente su pureza. (Dodds y Roberts, 1982).

3.1 Cultivo de Tejidos Vegetales en la Familia Solanaceae.

La familia Solanaceae se ha caracterizado por ser un material biológico muy adecuado para estudios in vitro, actualmente diferentes especies solanáceas son empleadas como modelos para diversas técnicas de cultivos asépticos vegetales.

Muchas de las investigaciones realizadas con especies solanáceas han resultado ser trabajos pioneros que han marcado pautas a seguir.

En 1934 White realizó el primer cultivo exitoso de órganos utilizando ápices de raíces de jitomate (Lycopersicon esculentum) Con este trabajo White demostró el potencial ilimitado de crecimiento que tienen los tejidos cultivados in vitro (Gautheret, 1982).

Skoog y Miller en 1957 postulan la teoría del balance hormonal, quienes utilizaron diferentes dosis y proporciones relativas de auxina y de citocinina con lo cual consiguen inducir a voluntad la formación de brotes y raíces en cultivos de callo de Nicotiana tabacum.

La totipotencialidad celular implícita en la teoría celular postulada por el fisiólogo Schwan es demostrada por Vasil y Hildebrandt 1965, (citado por Flick, 1983a) cuando consiguen regenerar plantas completas a partir de células aisladas de Nicotiana tabacum.

Murashige y Skoog (1962) desarrollaron un medio de cultivo con el que lograron un crecimiento rápido en tejidos de Nicotiana tabacum, actualmente este medio es uno de los más ampliamente utilizados con éxito en gran número de especies, y para muy

diversas técnicas.

Smith y Murashige, 1970 (citado por Navarro, 1987) regeneraron plantas a partir de domos apicales desprovistos de primordios foliares, concluyendo con esto, que para las angiospermas el desarrollo adecuado de los meristemas no requiere de reguladores de crecimiento suplementados en el medio de cultivo. Las especies utilizadas fueron: Nicotiana glauca, N. tabacum, Daucus carota, Tropaeolum majus, Coleus blumei.

Otra notable aportación a las técnicas de cultivo de tejidos in vitro realizada con especies solanáceas, la constituye el trabajo de Melchers et al., (1980, citado por Fári y Czakó, 1981) quienes obtuvieron híbridos somáticos intergenéricos por fusión de protoplastos de jitomate (Lycopersicon esculentum) y papa (Solanum tuberosum).

Flick et al., (1983a) reporta que la mayoría de las especies del género Petunia presentan gran facilidad para la regeneración vegetal a partir de protoplastos, en general la regeneración de plantas in vitro parece ser más fácilmente inducible en la familia solanácea, ya que 38 de 42 especies estudiadas en esta familia han sido regenerados in vitro.

Actualmente se le ha dado gran énfasis al área de síntesis y extracción de productos naturales, como por ejemplo los fármacos, a partir de cultivos de callos (Deus, 1982; Zenk, 1982, citados por Barba, 1987) así, como de cultivo de órganos principalmente de raíces de varias especies solanáceas, como Atropa belladonna (Kamada, 1986) para el cual se ha logrado implementar un sistema de producción de alcaloides en cultivos in vitro de raíces, las cuales tuvieron igual o incluso mayor producción de alcaloides en

comparación con las plantas in vivo.

3.1.1 Cultivo de Tejidos Vegetales en el Genero Datura.

Si bien la familia Solanaceae se ha caracterizado por ser un material muy adecuado para estudios in vitro, el género Datura no ha sido la excepción, ya que diversas investigaciones realizadas con diferentes especies de Datura han significado aportaciones trascendentes y novedosas.

Las primeras plantas haploides que se obtuvieron fueron a partir de anteras cultivadas in vitro de Datura innoxia. (Guha y Maheshwari, 1964, citados por Flick et al, 1983a.)

Los cultivos in vitro de ápices de Datura y de Lycopersicon esculentum han podido ser mantenidos en cultivo por tiempo indefinido en medio líquido que contenía sales inorgánicas, sacarosa y extracto de levadura, logrando establecer y mantener de esta manera un cultivo continuo de raíces. (Luna, 1987).

Datura innoxia ha sido considerada como el material ideal para estudios de regeneración vegetal (Engvild, 1973, citado por Flick, 1983a), e hibridaciones somáticas (Schieder, 1978, citado por Flick, 1983a y por Schieder, 1984.)

Diferentes especies de Datura, actualmente se emplean como plantas modelo para genética celular somática utilizando protoplastos y células en suspensión de plantas diploides ($2n=24$) o bien plantas haploides ($n=12$).

Protoplastos diploides de Datura innoxia se han usado para realizar exitosas hibridaciones somáticas (Schieder, 1978, 1980, 1982, citado por Schieder, 1984).

Al igual que otras especies solanáceas que producen alcaloides del grupo del tropano. El género Datura ha sido objeto de numerosas investigaciones que pretende utilizar técnicas biotecnológicas para la producción de alcaloides utilizando cultivos de callos (Chan, 1965) o bien de raíces, pues algunos investigadores afirman que la producción de metabolitos secundarios como los alcaloides requieren probablemente para su síntesis, de tejidos organizados y diferenciados en órganos, mientras que otros biotecnólogos, suponen que los mecanismos genéticos que desencadenan la formación de los alcaloides puede darse de igual manera en tejidos desdiferenciados como los callos. (Staba, 1980).

3.1.2 Cultivo de Embriones Zigóticos *in vitro*

El cultivo de embriones zigóticos vegetales *in vitro* es una técnica que se ha venido desarrollando a lo largo del presente siglo al inicio del cual Hännig, 1904, (citado por Collins, 1984; Hu, 1986; Monier, 1978.) fue el primer investigador que intentó cultivar embriones vegetales *in vitro*, él tuvo éxito en conseguir el desarrollo de embriones de 2 milímetros de longitud Hännig utilizó dos especies de la familia Brassicaceae: Raphanus sp. y Cochlearia sp.

Algunas de las aportaciones de Hännig a la técnica de cultivo de embriones continúan siendo válidas hoy día. El enfatizó la importancia de utilizar altas concentraciones de sacarosa para prevenir la germinación precoz de los embriones. El conocimiento de este hecho es de gran trascendencia, pues este es uno de los aspectos que fundamentalmente se deben considerar en la formulación del medio de cultivo para embriones inmaduros.

Stingl, 1907, (citado por La Rue, 1936) separó embriones de diversos cereales de su propio endospermo y los transfirió y cultivó en el endospermo de otras especies de cereales, encontró que el endospermo de Secale sp. resulta mejor para el crecimiento de embriones de Triticum sp. que su propio endospermo. Los embriones de Hordeum sp. crecieron mejor en el endospermo de Triticum sp. que en el de su misma especie.

Este trabajo experimental representa un fundamento teórico muy importante para la técnica de cultivo de embriones, ya que demuestra que el embrión para su germinación no requiere específicamente de algún endospermo de su misma especie. El conocimiento de este hecho motivó numerosas especulaciones sobre

si el endospermo de una semilla podía ser sustituido por algún medio de cultivo que permitiera el desarrollo y germinación de los embriones.

Knudson (1922) demostró que las semillas de orquídeas pueden ser germinadas sin la presencia de microorganismos simbióticos haciéndolos crecer en un medio nutritivo de agar que contenía sacarosa, en la ausencia del carbohidrato, las semillas no consiguieron desarrollarse más allá del estado de protocormo.

Las semillas de orquídeas representan un interés muy particular ya que contienen embriones morfológicamente indiferenciados que corresponden al estado globular de las dicotiledóneas, no presentan tejidos de almacenamiento o endospermo alguno que puede interferir con estudios de los requerimientos nutricionales. Y las cubiertas de la semilla se reduce a una estructura membranosa, por esas razones el óvulo fertilizado de una orquídea es considerada como un embrión en cultivo (Raghavan y Torrey, 1964, citados por Raghavan, 1977.).

Otro aspecto interesante de la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas es un método que permite superar la dormancia natural de estas semillas que les impuesta por el embrión rudimentario que presentan. (Knudson, 1922).

El cultivo asimbiótico de las semillas de las orquídeas tiene un gran importancia teórica por los aspectos señalados anteriormente, sin embargo, estos conocimientos se han aplicado con propósitos prácticos de gran importancia económica, pues la propagación comercial de orquídeas a través de la aplicación de estos métodos ha alcanzado un desarrollo sin paralelo.

Los factores que controlan el crecimiento de los embriones de oaquídeas en cultivo ha sido extensamente revisados por Arditti (1967).

Dietrich, 1924, (citado por La Rue, 1936) intentó cultivar embriones de angiospermas más pequeños que los empleados por Hännig en 1904 sin tener éxito, sin embargo, probó que las complicadas formulaciones que Hännig utilizó pueden ser remplazadas por otras más sencillas

Otro investigador que realizó importantes contribuciones fue Tukey (Yeung, 1981), quien reportó haber desarrollados embriones de cerezo en un medio artificial en el año de 1933 y en 1934 publicó sus exitosos resultados sobre el desarrollo de embriones de diversos frutales, Tukey utilizó en sus investigaciones embriones cercanos a la madurez, encontrado infructuoso su intento de cultivar embriones inmaduros (La Rue, 1936).

Otra contribución notable la realizó La Rue en 1936, quien cultivó exitosamente embriones de una amplia gama de especies vegetales tanto dicotiledoneas como monocotiledoneas, utilizó el medio de cultivo de White en forma sólida para las especies monocotiledoneas y para la mayoría de las dicotiledoneas. Para algunos casos de embriones de las especies dicotiledoneas, encontrando que los embriones se desarrollan de manera óptima en medio sólido con agar-agar al 0.75%. La Rue utilizó extractos naturales complejos como el extracto de levadura demostrando que puede tener un efecto favorable en el desarrollo de los embriones, aunque, no es indispensable en el desarrollo embrionario.

Después de estos trabajos pioneros quedó claro que los

embriones maduros para completar su desarrollo o germinación solamente requerían de una solución nutritiva y una fuente de energía, sin embargo, los embriones inmaduros seguían siendo difíciles de hacer crecer. Fue Monnier en 1978 quien sentó las bases fisiológicas del cultivo de embriones inmaduros.

La notable contribución de Monnier, consiste en haber determinado las sucesivas variaciones de los requerimientos del embrión durante su desarrollo, ya que a lo largo de la embriogénesis la evolución morfológica del embrión va acompañada de una transformación fisiológica. Esto lo podemos ver claramente en el hecho de que a lo largo de su ontogenia el embrión cambia progresivamente de una etapa heterótrofa a otra etapa en la que es fisiológica y nutricionalmente independiente del tejido materno (autótrofa). Estos cambios se suceden paralelamente a cambios morfológicos importantes como son: la desaparición del suspensor que es la conexión vascular del embrión con el tejido materno que esta presente en las formas: globular, acorazonada, torpedo inicial; mientras que en las formas de torpedo maduro y cotiledonaria el suspensor ha desaparecido y así el embrión alcanza una etapa independiente del tejido materno, el conocimiento de estos tres eventos nos permite suponer que para el cultivo de embriones los que se encuentran en etapas maduras requieren de medios nutritivos menos complejos que los embriones inmaduros.

Los embriones en cultivo *in vitro* requieren de modificaciones constantes en la concentración de sales minerales, aminoácidos y sacarosa. Por ejemplo, los embriones inmaduros requieren de

altas concentraciones de sacarosa la cual debe decrecer gradualmente conforme el desarrollo embrionario se lleva a cabo. Estos altos requerimientos de sacarosa de los embriones inmaduros deben ser proporcionados a fin de reproducir in vitro las condiciones intraovulares en las que ocurre el desarrollo embrionario, la ontogenia vegetal se realiza en un medio con una presión osmótica variable a lo largo del proceso, en las primera etapas existe una presión osmótica anormalmente alta, se ha encontrado en el endospermo que rodeaba a embriones en estado acorazonado de Gossypium hirsutum presiones osmóticas de hasta 10 atmosferas (Kerrand and Anderson, 1944, citado por Hu, 1986). Esto se debe probablemente a la aferencia de fotosintatos demandados para la formación del endospermo, que en un principio se encuentran en unidades de monosacáridos y de esta manera presentan una mayor osmolaridad, pero a medida que el proceso de la formación de la semilla avanza los monosacáridos son progresivamente polimerizados en cadenas de almidón los cuales de esta manera ejercen una menor presión osmótica de ahí que para el cultivo in vitro de embriones de diverso estado de desarrollo podemos hacer las siguientes generalizaciones:

- 1) los embriones más inmaduros requieren de un medio de cultivo más complejo a menudo suplementado con diferentes combinaciones de vitaminas, aminoácidos y en algunos casos requieren de extractos complejos de endospermo como el agua de coco. así como de concentraciones de sacarosa notablemente altas (12%) (Monnier, 1978).

- 2) la elevada presión osmótica no debe ser necesariamente proporcionada por altas concentraciones de sacarosa, Tambien

puede utilizarse un osmótico como el manitol que es un carbohidrato fisiológicamente inerte, aunque otros investigadores han reportado el uso de manitol como tóxico para el crecimiento embrionario (Ball, 1959; Pretova, 1974, citados por Hu, 1986.).

Mientras que los embriones relativamente maduros pueden hacerse crecer en un medio nutritivo con sales inorgánicas suplementadas con una fuente energética como la sacarosa (Yeung, 1981).

Las altas concentraciones de sacarosa no solo tratan de reproducir en cultivo las condiciones intraovulares sino que impiden la germinación precoz de los embriones que se desarrollarían como pequeñas plántulas débiles en vez de completar su desarrollo embrionario normal (Hu, 1986; Monnier, 1978; Collins 1984).

Estas continuas variaciones en los requerimientos de los embriones motivaría que para ser cultivados *in vitro* se hicieran transferencias periódicas y secuenciales de los embriones de un medio de cultivo a otro que tuviera una composición apropiada para cada estado embrionario, Monnier diseñó un dispositivo que asegura una variación continua en la composición del medio con el paso del tiempo, dos medios de cultivo de diferente composición son colocados en yuxtaposición en una caja de petri. Uno de los dos medios es servido alrededor de un objeto cilíndrico de vidrio en el centro de la caja de petri, después de que el primer medio se haya solidificado. El objeto del centro es removido, resultando un orificio central. Un segundo medio de diferente composición es servido dentro de este hueco central. Los

embriones aislados son cultivados sobre este segundo medio. Como resultado de la difusión de los constituyentes de los dos medios el embrión esta sujeto a la acción de variaciones en la composición del medio de cultivo con el paso del tiempo, con la utilización de este dispositivo logró por primera vez cultivar embriones de Capsela sp. en estado globular (50 micras) hasta la madurez sin interrupción alguna. (Monnier, M. 1978)

Requerimientos Nutricionales de los Embriones en Cultivo in vitro Carbohidratos.

La mejor fuente de energía para los embriones en cultivo es sin duda alguna la sacarosa. Muchos autores ha demostrado la superioridad de la sacarosa comparada con otros azúcares, para conseguir el crecimiento y desarrollo de los embriones en cultivo in vitro (Hu et al., 1979, citado por Hu, 1986; Collins, 1984; Monnier, 1978).

El rango de sacarosa empleado es variable de acuerdo al nivel de desarrollo embrionario de que se trate, esta puede variar desde el 3% para embriones maduros hasta el 12.5% para embriones en niveles de desarrollo muy tempranos (Collins, 1984).

Medio de Cultivo.

Los medios de White (1963), Murashige y Skoog (1962) y el diseñado por Gamborg y denominado B5 (Gamborg et al 1968.) son los medios de cultivo más generalmente empleados, los cuales frecuentemente se emplean con pequeñas modificaciones, sin embargo, la generalidad de los investigadores adoptan la formulación original de alguno de esos medios (Hu, 1986). Monnier (1978) señaló que los embriones en cultivo son muy sensibles a

las soluciones empleadas y que es recomendable realizar ajustes y modificaciones empíricas para diseñar un medio de cultivo que promueva un crecimiento embrionario con un mínimo de toxicidad ya que frecuentemente las soluciones minerales que promueven el crecimiento son tóxicas para el crecimiento de los embriones, mientras que formulaciones no tóxicas no son capaces de inducir una diferenciación normal de los embriones. (Monnier, 1971, citado por Monnier, 1978).

Fuente de Nitrógeno.

Las maneras de proporcionar el nitrógeno a los embriones en cultivo pueden ser diferentes, ya sea que se proporcione en forma orgánica e inorgánica, la forma más frecuente es de manera inorgánica, la cual puede ser a manera de nitrato o bien de amonio. las sales que se utilizan más frecuentemente en el cultivo de embriones como fuente de nitrógeno inorgánico son NH_4^+ NO_3^- y KNO_3 .

Muy frecuentemente el amonio resulta más benéfico para el desarrollo embrionario. Las siguientes especies y grupos de plantas han mostrado tener un mejor desarrollo con la utilización de amonio.

<u>Capseila</u> sp.	Umbeck y Norstog, 1979.	
Orquídeas	Raghavan y Torrey, 1964.	
<u>Datura</u>	Matsubara, 1964.	(Hu, 1986).

El uso del nitrato resultó especialmente benéfico para las siguientes especies y grupos de plantas.

<u>Corchorus</u>	Mitra y Datta, 1951.	
Brasicaceae (Cruciferae)	Rijven, 1958.	(Hu, 1986)

Otra manera de proporcionar nitrógeno a los embriones en cultivo in vitro es adicionando aminoácidos o bien amidas. De los aminoácidos empleados la glutamina es la más efectiva para estimular el crecimiento embrionario en cultivo. (Hu, 1986; Collins, 1984) La asparagina ha mostrado ser eficaz en algunos taxa (Paris et al., 1953 citado por Hu, 1986) mientras que en otros taxa ha resultado inhibitorio (Matsubara, 1964 citado por Hu, 1986).

La evidencia sugiere que los mecanismos de utilización del nitrógeno son diferentes de una especie a otra y estan muy afectadas por la madurez del embrión y las condiciones de cultivo (Collins, 1984).

Reguladores del Crecimiento.

Los embriones en cultivo deben ser considerados como una planta integra con todos sus centros de síntesis de hormonas endógenas por lo que para su desarrollo no es necesario la adición de sustancias hormonales, ya que al agregar estas sustancias se inducen modificaciones en el patrón ontogenético de los embriones (Monnier, 1978; Hu, 1986; Collins, 1984).

El cultivo de embriones en un medio suplementado con Kinetina suprime el crecimiento radicular y una expansión precoz de las hojas (Monnier, 1976, citado por Monnier 1978), mientras que las giberelinas producen plántulas excesivamente alargadas y delgadas (Veen, 1961, citado por Monnier, 1978). Sin embargo. existen casos reportados en los que la adición de hormonas han facilitado

el cultivo de embriones. La Rue, (1936) encontró que bajas concentraciones de ácido indolacético (IAA 0.05mg/l) son útiles en el cultivo de embriones de varias especies. Raghavan y Torrey, 1963 citados por Collins, 1984 demostraron que las bajas concentraciones de IAA ayudaron al desarrollo de embriones globulares de Capsella. Phillips, 1981 (citado por Collins, 1984) encontró que moderados niveles de auxina con bajo niveles de citocinina ayudaban al crecimiento y sobrevivencia de embriones acorazonados de híbridos interespecíficos de Trifolium sp.

Cuando se cultivan embriones muy inmaduros, el ácido absísico suplementado al medio de cultivo evita la germinación precoz de los embriones (Hu, 1986), además de que estimula el crecimiento embrionario, el ácido absísico se encuentra normalmente presente en el líquido intraovular presuntamente para suprimir la germinación precoz y mantener el desarrollo embrionario en su curso ontogenético normal (King, 1976; Hsu, 1978. citados por Hu, 1986.)

A causa de la naturaleza juvenil del tejido embrionario, los embriones presentan un alto potencial morfogénico, por lo que resultan una excelente fuente de explantes para la micropropogación clonal masiva esto es especialmente cierto para coníferas y gramíneas, por lo que los embriones cultivados con este propósito son suplementados con altas concentraciones de citocinina (Aitken, 1984; Hu, 1986).

Vitaminas.

Aunque las vitaminas no han demostrado ser esenciales para el cultivo exitoso de embriones, las vitaminas comunmente adicionadas son: Biotina, Tiamina, Acido Pantoténico, Acido

Ascórbico, Inositol y Piridoxina.

Caseína Hidrolizada.

Esta sustancia ha demostrado ser efectiva en promover el desarrollo embrionario, aunque pueden proveer los aminoácidos indispensables puede también afectar la osmolaridad del medio (Ziebur et al, 1950; Inomata, 1978b, citados por Collins, 1984).

Las Aplicaciones Prácticas del Cultivo de Embriones.

El cultivo in vitro de embriones cuenta actualmente con una amplia gama de aplicaciones, sin embargo las más trascendentes son:

- 1.-) El Rescate de Embriones de Cruzas Intergenéricas e Interspecificas.
- 2.-) Superar la Dormancia y la Esterilidad de las Semillas.
- 3.-) Micropropagación Clonal.

Rescate de Embriones Híbridos Interspecificos e Intergenéricos.

Actualmente es un hecho demostrado que los embriones híbridos inviábiles tienen el potencial para iniciar el desarrollo y llegar convertirse en plantas maduras, pero en condiciones naturales el embrión está impedido para alcanzar su tamaño adulto con una diferenciación normal. La fertilización y los primeros eventos del desarrollo embrionario ocurren de una manera aparentemente normal, pero las irregularidades posteriores conducen inevitablemente al aborto embrionario. La formación del endospermo precede y sostiene nutricionalmente al embrión en desarrollo, por lo que la malformación del endospermo

frecuentemente resulta ser la causa principal del aborto embrionario (Collins, 1984).

Existen otras causas de aborto embrionario como la formación de tumores intraovulares que impiden el desarrollo del embrión (Raghavan, 1976, citado por Collins, 1984; Satina, 1950) El aislamiento y cultivo aséptico de estos embriones en un medio nutritivo de cultivo adecuado frecuentemente permite superar estas barreras postcigóticas, de esta manera es como esta técnica ha sido empleada para conseguir híbridos interespecíficos de varios géneros de diversas familias, entre los ejemplos más notables podemos mencionar a las cruzas interespecíficas realizadas en especies de interés agronómico las cuales permiten reunir en un solo individuo las características deseables de dos especies o géneros diferentes, además de representar para el fitogenetista una fuente más amplia para inducir variabilidad genética pues con esta técnica es posible transferir genes de una especie a otra y aún de un género a otro ya que estas especies pueden ser utilizadas como puente genético entre las especies paternas hibridizadas si se retrocruzan con estos híbridos.

De lo anteriormente expuesto se puede deducir claramente que la más espectacular de las aplicaciones prácticas de las técnicas de del cultivo de embriones in vitro es la de superar la inviabilidad de embriones híbridos.

El Cultivo de Embriones Para Superar la Dormancia de la Semillas.

Las semillas de muchas especies muestran una incapacidad para germinar, inclusive bajo condiciones óptimas de humedad, oxígeno y temperatura, a este fenómeno se le denomina dormancia, la cual puede ser ocasionada por diversos factores que actúan solos o en combinación. La superación de esta condición no sucederá a menos que se proporcione el tratamiento adecuado, una solución alternativa a este problema consiste en aislar estos embriones y cultivarlos *in vitro*.

Los factores más comunes que causan la dormancia en las semillas son:

- i.-) Cubierta Impermeable a) al oxígeno. b) al agua.
- ii.-) Resistencia Mecánica a la Expansión del Embrión.
- iii.-) Embrión Rudimentario.
- iv.-) Inhibidores Endógenos.
- v.-) Almacenamiento en Seco.
- vi.-) Baja Temperatura.
- vii.-) Luz. (Cronquist, 1982; Hartman, 1988)

El cultivo de embriones ha sido aplicado para superar la dormancia producida por diversas causas. En la tabla N^o 3, se muestran las diferentes especies vegetales en las cuales el uso de esta técnica ha permitido el desarrollo embrionario.

Factor Causante de la Dormancia.	Especie Utilizada.	Referencia.
Inhibidores Endógenos.	<u>Iris</u> sp.	Randolph y cox, 1946
	<u>Elaeis guineensis</u>	Rabéchault, 1967
Luz.	<u>Lactuca sativa</u>	Ikuma y Thimann, 1963
	<u>Citrullus colocynthis</u>	Koller etal.,1963
	<u>Phacelia tenacetifolia</u>	Chen, 1970.
	<u>Nemophila insignis</u>	Chen, 1968.
Baja Temperatura.	Varias.	Stokes, 1965.
Almacenamiento en Seco.	<u>Avena fatua</u>	Simpson,1965.
Embrión Rudimentario.	Orquídeas.	Knudson, 1922.

Tabla N° 3 Diferentes especies donde se ha utilizado la técnica de cultivo in vitro para superar la dormancia impuesta a las semillas por diversas causas (Tomado de: Collins, 1984; Raghavan, 1977).

Micropropagación Clonal.

El uso de las técnicas in vitro para la propagación clonal masiva es una de las aplicaciones más avanzadas del cultivo de tejidos vegetales. La propagación clonal masiva puede ser conseguida por alguno de los siguientes métodos:

- a) Liberación de las Yemas Axilares de la Dominancia Apical.
- b) Generación de Brotes Adventicios.
- c) Embriogénesis Somática.

Los brotes adventicios pueden ser inducidos en su formación a partir de tejidos en los cuales normalmente no se producen esos órganos. Este procedimiento es mucho más común que la embriogénesis somática y tiene mucho más potencial para la propagación clonal que la utilización de yemas axilares. Una vez generados estos brotes adventicios pueden ser individualizados y enraizados o bien ser utilizados como explante para generar más brotes adventicios.

Los embriones cigóticos resultan un excelente material para la propagación clonal in vitro debido a que la utilización de estos representa para el investigador numerosas ventajas por las siguientes razones:

- i) El material con las características más juveniles presenta una más fácil morfogénesis in vitro (Thorpe, 1984). esta

capacidad de regeneración se ha visto disminuida en tejidos más diferenciados como en el caso de las Gramíneas donde aún las plántulas recientemente germinadas han perdido su capacidad morfogénica. (Hu, 1986).

ii) La cubierta de las semillas puede fácilmente tolerar severos tratamientos de esterilización superficial.

iii) El tejido dentro del óvulo es completamente estéril pudiendo ser removido asépticamente del óvulo y ser cultivado in vitro (Colins, 1984).

iv) El embrión zigótico es frecuentemente usado como fuente de brotes adventicios en la propagación clonal de diversas plantas principalmente en la clonación de gimnospermas (Aitken, 1984)

iv) El embrión zigótico está constituido por tejido parenquimático con bajo nivel de diferenciación, el cual es susceptible de ser dirigido hormonalmente en su morfogénesis a voluntad, utilizando diferentes concentraciones y proporciones relativas de auxina y citocinina (Skoog y Miller, 1957).

Otros Aspectos Aplicados del Cultivo de Embriones Zigóticos.

Las técnicas del cultivo de embriones zigóticos han sido empleadas para aclarar problemas fundamentales de la embriogénesis, sin embargo la creciente sofisticación de los métodos de cultivo de embriones ha hecho posible que su utilización se extienda a otras aplicaciones además de las antes mencionadas. Actualmente estas técnicas han sido aplicadas en 72 géneros vegetales diferentes (Pierik, 1979 citado por Hu, 1986).

A continuación se presenta una lista de géneros y especies en los cuales el cultivo de embriones zigóticos ha sido utilizados exitosamente para superar problemas en procesos reproductivos y de crecimiento.

ESPECIE	PROPOSITO DEL CULTIVO DE EMBRIONES.	REFERENCIA
<u>Zea mays</u>	Determinar la Calidad de la Semilla.	Mukerji, 1951
<u>Cattleya</u> <u>Laelia</u>	Germinación asimbiótica	Knudson, 1922
<u>Colocasia</u> <u>sculentum</u>	Superar la Autoesterilidad.	Abraham y Ramachandran. (1960).
<u>Iris</u> sp.	Acelerar la Germinación.	Randolph y Cox (1943).
<u>Phaseolus</u> <u>vulgaris</u> .	Estudio de la Relación Parásito-Hospedero.	Padmanabhan, (1967).
<u>Prunus</u> <u>avium</u>	Superar la Baja Viabilidad de las Semillas.	Tukey (1933).
<u>Hordeum</u> sp.	Selección de Mutantes con Alto Contenido de Aminoácidos Específicos.	Landa, (1980).
<u>Cuscuta</u> <u>reflexa</u> .	Germinación de Semillas de Parásitos Obligados.	Maheswari y Baldev, (1961)

Tabla Nº 4. Aspectos aplicados de las técnicas del cultivo de embriones zigóticos. (Raghavan,1977; Collins, 1984).

3.1.3. Cultivo de Embriones Zigóticos del Género Datura.

El trabajo pionero de Van Overbeek (1941) hizo aportaciones notables a las técnicas de cultivo de embriones zigóticos in vitro consiguiendo el desarrollo de embriones de Datura en un medio de cultivo artificial desde un nivel de desarrollo muy temprano (corazón 0.3 mm. de largo) hasta conseguir plantas viables. Antes del trabajo de Van Overbeek existieron numerosos reportes de investigaciones sobre el cultivo de embriones maduros aislados y desarrollados in vitro, sin embargo, no habían sido reportados en la literatura cultivos exitosos de embriones inmaduros in vitro. La innovación de Van Overbeek consistió en suplementar su medio de cultivo con agua de coco con y sin autoclavar:

los embriones cultivados en medio de cultivo sin agua de coco desarrollaron hipocótilo epicótilo sin crecimiento de los cotiledones, resultando unas plántulas inviables.

Los embriones cultivados en el medio adicionado con el agua de coco mostraron un buen desarrollo de los cotiledones y del hipocótilo, las hojas primarias se desarrollaron de un largo igual al de los cotiledones, la radícula no se desarrolló hasta que fueron transferidos a un medio de cultivo sin agua de coco ya que probablemente algún inhibidor del enraizamiento de tipo auxínico termocstable estuviera presente.

Van Overbeek, interpretó estos resultados de la siguiente manera, los embriones muy inmaduros son incapaces de sintetizar sus propios factores de crecimiento. En experimentos posteriores Blakeslee, (1944) demostró que el extracto de malta al 3% podía

reemplazar exitosamente el agua de coco en todos los cultivos de embriones de Datura. e) Efecto de los aminoácidos en los embriones cultivados. Sander y Burkholder (1948, citado por Rietsema, 1959) encontraron que los embriones de Datura innoxia y Datura stramonium se desarrollaban bien tanto en un medio de cultivo adicionado con una mezcla de aminoácidos como en medios de cultivo suplementados con caseína hidrolizada o extracto de malta pero no fueron capaces de identificar un aminoácido en particular como el agente promotor del crecimiento embrionario ya que uno solo no pudo sustituir a la mezcla compleja de aminoácidos.

Una vez que los trabajos de Van Oberbeek permitieron el desarrollo de embriones inmaduros en cultivo in vitro otros investigadores empezaron a darle a estos conocimientos una aplicación práctica, así que el siguiente paso fue la utilización de las técnicas de cultivo in vitro para rescatar embriones híbridos interespecíficos de varios géneros; El conseguir híbridos interespecíficos del género Datura constituyó un reto para muchos investigadores, una vez que tuvieron disponibles las herramientas del cultivo de embriones y de el "factor embrionario", lo que permitió rescatar embriones de hibridaciones tanto en cruza que presentan solamente barreras postcigóticas (cruzas compatibles) como cruza en las que existen impedimentos precigóticos y postcigóticos (cruzas incompatibles). Blakeslee (1944) obtuvo las primeras "plantas mula" del género Datura desarrollando híbridos interespecíficos y disectando esos embriones inmaduros una vez que superaron el estado de proembrión y cultivandolos en un medio artificial adicionado con el " factor embrionario", lo

que permitiría el desarrollo de esos embriones, Blakeslee encontró que el extracto de malta puede reemplazar exitosamente a la leche de coco utilizada por Van Overbeek si es esterilizado por filtración en vez de esterilizarlo con calor. Blakeslee realizó un intenso trabajo hibridando las diez especies entonces conocidas del género Datura, Aunque, no consiguió hibridar D. ceratocaula con las otras especies de Datura lo cual no debe sorprender considerando las grandes diferencias morfológicas de D. ceratocaula respecto a todas las demás especies de Datura.

Mc Lean, (1946) utilizó la disección y cultivo de embriones para superar las barreras postcigóticas que impedían estas hibridaciones interespecíficas que parecían imposibles de lograrse, Mc Lean realizó 18 hibridaciones entre D. ceratocaula y otras nueve especies de Datura obteniendo en 12 de estas 19 combinaciones embriones disectables que fueron cultivados y desarrollados in vitro hasta su madurez. La hibridación de todas las especies de Datura con D. ceratocaula resultan incompatibles si se realizan cruza D. sp X D. ceratocaula como especie materna excepto la crusa D. ceratocaula (hembra) X D. metel (macho) en las que resultaron embriones susceptibles de ser disectados y cultivados hasta la madurez. En las hibridaciones Datura ceratocaula (hembra) X D. discolor (macho) y D. ceratocaula (hembra) X D. inoxia (macho) se obtuvieron embriones que fueron disectados y cultivados y aunque crecieron no alcanzaron la madurez. Por otro lado en las cruza compatibles de D. sp. X D. ceratocaula como especie paterna si hay formación de embriones

híbridos disectables en cada una de las 9 cruzas interespecíficas posibles y que alcanzaron la madurez al ser cultivados in vitro.

Sanders (1950) realizó un análisis comparativo del crecimiento de embriones cultivados in vitro entre los embriones provenientes de óvulos autopolinizados y embriones híbridos interespecíficos compatibles entre las especies D. stramonium, y D. discolor, y las cruzas incompatibles D. inoxia X D. metel, D. discolor X D. stramonium, D. inoxia X D. discolor, D. inoxia X D. stramonium y D. metel X D. inoxia.

Los embriones fueron desarrollados en un medio de cultivo con tres concentraciones de sacarosa, con y sin 0.5% de extracto de malta. Los embriones autopolinizados fueron disectados en estadio de corazón (0.2 mm. de largo). Como resultado de esta comparación del crecimiento de los embriones híbridos interespecíficos con los embriones de óvulos autopolinizados de las especies parentales Sanders (1950) encontró que para las series de experimentos suplementados con los compuestos orgánicos mostraron un comportamiento en su crecimiento que se mostró intermedio entre la especies parentales u ocasionalmente parecidos a una u otra de sus especies parentales y los híbridos recíprocos fueron usualmente similares.

4.0 OBJETIVOS.

El género Datura es un ejemplo representativo de la gran diversidad vegetal mexicana, ya que nuestro país es considerado un centro de origen y diversificación del género, pues de los once taxas conocidas de Datura que crecen en México, 10 de ellos se reconocen como nativos de nuestro país (Bye, 1989), además de que existen varias especies Mexicanas endémicas.

Esta gran diversidad genética del género Datura aunada a su gran potencialidad de generar satisfactores de naturaleza farmacológica justifica plenamente que se desplieguen amplios recursos que nos permitan optimizar el aprovechamiento de este valioso recurso genético Mexicano.

En particular, los objetivos de la presente investigación fueron:

- 1.) Aplicar las técnicas de cultivo de tejidos vegetales a Datura stramonium que constituye un gran recurso genético potencial de interés farmacológico.
- 2.) Conocer la respuesta morfogénica de embriones cigóticos de Datura stramonium inducida por el efecto de diferentes concentraciones, proporciones relativas y combinaciones de dos diferentes auxinas con dos citocininas.
- 3.) Determinar los reguladores de crecimiento así como los mejores tratamientos a los cuales existe una óptima respuesta morfogénica susceptible de ser empleada para manipulaciones biotecnológicas posteriores en eventos de regeneración vegetal para la clonación y propagación masiva de individuos élite altamente productores de alcaloides
- 4.) Proponer un modelo de micropropagación para Datura stramonium.

5.0 MATERIALES Y METODOS.

5.1 Material Biológico.

Para la realización de la presente investigación se utilizaron semillas de Datura stramonium obtenidas de cápsulas maduras de plantas que crecían en el campus universitario del Pedregal de San Angel. La colecta se realizó en octubre de 1988, de los individuos colectados se conservan ejemplares herborizados depositados en el Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Jardín Botánico de la U.N.A.M.

Las ventajas de la utilización de Datura stramonium para experimentos que involucran eventos de reproducción, polinización y fecundación son varias y muy importantes entre las que podemos enumerar las siguientes:

Datura stramonium es una especie autógena que puede ser considerada como una línea pura, que por su endogamia repetida le ha ocasionado un alto grado de homocigocidad. Las especies de Datura generan un alto número de semillas, lo cual permitió realizar la presente investigación con semillas de varios frutos, todos ellos procedentes de la misma planta.

Los dos hechos mencionados anteriormente, representan para una investigación como esta, una gran importancia pues con estos se reduce la variabilidad genética intrínseca de los organismos.

Los explantes utilizados para este estudio fueron embriones zigóticos maduros aislados de sus cubiertas seminales y desprovistos de su endospermo. El objeto de utilizar embriones

maduros tiene dos importantes ventajas: Los embriones maduros se encuentran en un estado autótrofo donde es fisiológica y nutricionalmente independiente del tejido materno, los embriones maduros tienen la capacidad de sintetizar sus propios factores de desarrollo mientras que los más inmaduros no lo son (Van Overbeek, 1941), además de que invariablemente los embriones muy inmaduros requieren de extensos refinamientos en la formulación del medio de cultivo, los cuales deben de ser empíricamente determinados, lo que hace evidente que el aspecto más importante del cultivo de embriones inmaduros es la definición del medio de cultivo necesario para sustentar el crecimiento y desarrollo de los embriones (Collins, 1984). Otros autores cuando se refieren a la difícil sobrevivencia de embriones muy inmaduros cultivados *in vitro*, atribuyen su imposibilidad de desarrollarse en cultivo a otras causas entre las que podemos mencionar:

El medio no contiene los elementos indispensables para la sobrevivencia del embrión, o bien, porque la separación de el embrión del tejido materno causa una lesión, al nivel del suspensor al cual las células embrionarias no pueden sobrevivir, ni a la repentina penetración del medio de cultivo a través de la herida (Monnier, 1978), Esta hipótesis se ha visto confirmada de una manera indirecta al cultivar exitosamente embriones globulares incluidos en el óvulo en cuyo caso el suspensor permanece intacto. (Monnier, 1984).

La otra gran ventaja consiste en que todos los embriones de una cápsula madura han alcanzado su tamaño máximo y éste es homogéneo, reduciéndose con esto las variaciones en la respuesta de los embriones en cultivo debido a la diversidad de su tamaño,

ya que los embriones inmaduros dentro de las semillas de la misma cápsula pueden variar los niveles de desarrollo, lo cual sugiere que existe competencia nutricional entre los óvulos en desarrollo. Examinando la distribución de los niveles de desarrollo embrionario dentro de una cápsula podría determinarse cuales de la semillas se encuentran en mejor disponibilidad de recibir el aporte nutricional. Son muy notables las diferencias en la condición y vigor de tales embriones cuando son cultivados in vitro. (Sanders, 1948)

5.1.1 Esterilización y Disección de los Explantes.

La desinfección superficial de las semillas se consiguió después de intentar diversos procedimientos, los cuales resultaron insuficientes para conseguir la eliminación de contaminantes fúngicos y bacterianos.

El primer procedimiento utilizado fue el diseñado por Kartha (1984) para la desinfección superficial de Pisum sativum el cual propone el siguiente tratamiento: 1.-) Etanol 70% (V/V) (1 minuto) 2.-) Hipoclorito de Sodio (NaOCl) 20% (V/V) (15 minutos), 3.-) 2 enjuagues en agua destilada estéril.

Para la solución de Hipoclorito de Calcio se empleó blanqueador comercial "Cloralex" con 8% de cloro activo.

El procedimiento descrito anteriormente aunque resulta adecuado para la esterilización superficial de semillas, no resultó suficiente para lograr una adecuada desinfección, ya que se presentó una contaminación generalizada por lo que se introdujeron variaciones en la concentración de Hipoclorito de Sodio. Las dosis empleadas fueron: 20%, 25% y 30% (v/v).

De la misma manera se incrementó el tiempo de exposición al Hipoclorito de Sodio, los períodos de tiempo fueron: 15, 20, y 25 minutos en agitación constante.

Aún después de incrementar la concentración de Hipoclorito de Sodio a 30% y por un tiempo de hasta 25 minutos de exposición al mismo, la contaminación en los cultivos continuó siendo generalizada, por lo que se intentó un procedimiento más drástico.

Para esto se recurrió al siguiente método de esterilización superficial: 1.-) Etanol al 70% (v/v) por 60 segundos, 2.-) Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 20 % (v/v) por 15 minutos, 3.-)

Inmersión de las semillas en ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado durante 30 segundos, 4.-) 3 enjuagues sucesivos en agua destilada estéril.

Este procedimiento, aunque, disminuyó la contaminación no la evitó de manera significativa. El tipo de contaminación que se presentó en los cultivos fue un hecho verdaderamente notable, ya que en todos los casos la contaminación fue de naturaleza bacteriana, además de que en todos los casos presentaban las mismas características coloniales, como la forma de crecimiento, bordes de la colonia, color y consistencia, esto, aunado al hecho de que se presentara contaminación después de un tratamiento de desinfección superficial tan severo, permite afirmar categóricamente que la contaminación bacteriana era sistémica. Por lo cual no era posible suprimirla con ningún procedimiento de desinfección superficial, por muy severo que fuera el tratamiento, incluyendo la inmersión de las semillas en ácido sulfúrico concentrado.

Algunos autores proponen para estos casos, la desinfección superficial de los embriones aislados con soluciones suaves de Hipoclorito de Sodio (Dahmen y Mock, 1971 citado por Hu, 1986),

Este procedimiento de desinfección directa del embrión, en términos generales, no es necesario, a menos que las cubiertas de las semillas se encuentren rotas, o bien cuando se conoce con seguridad la presencia de microorganismos que contaminen los embriones durante su disección (Hu, 1986).

Sin embargo, dado que, el tejido embrionario es tan frágil y susceptible de ser dañado por el hipoclorito de sodio se optó por

implementar otro procedimiento de desinfección con la utilización de antibióticos, para lo cual fue necesario aislar colonias bacterianas cuyo crecimiento surgió del explante en cultivo, se seleccionaron 4 cepas, que a simple vista eran ligeramente diferentes, posteriormente para la purificación de estas se sembraron los explantes contaminados en cajas de petri con medio de Muller-Hinton (M.H.) (BIOXON) con el fin de permitir que la colonia se difundiera en el medio agar-M.H. para lo cual las cajas de petri se incubaron a 32°C y por otro lado se tomaron muestras con una asa microbiológica directamente de los bordes del explante contaminado y se realizó una siembra estriada en cajas de petri con medio agar-M.H. y fueron también incubados a una temperatura de 32°C por 24 horas en posición invertida para evitar la evaporación del medio.

Se observó el crecimiento bacteriano en los dos casos y se seleccionaron las colonias que presentaron las mismas características morfológicas observables en el microscópio estereoscópico tomándose de cuatro a cinco colonias semejantes con una asa microbiológica previamente flameada y se inocularon 5 ml. de caldo nutritivo (BIOXON) y se dejaron a temperatura ambiente por dos a cuatro horas de donde se tomaron alícuotas de un mililitro de caldo nutritivo con el que se inocularon placas de medio Agar-M.H. con el propósito de verificar su pureza en base a sus características de crecimiento colonial (forma del borde, elevación de la colonia, consistencia, color, tamaño.).

Una vez purificadas las cepas se llevó a cabo la tinción de Gram, (ver apéndice 2) colocando una asada de cada una de las colonias aisladas y purificadas sobre un portaobjetos

(esterilizado en alcohol etílico al 70%) donde previamente se colocó una gota de agua esterilizada por filtración Milipore (0.45 μ m.) mezclando suavemente la asada con el agua, posteriormente se dejó secar (todo esto se realizó en condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar) después de lo cual se procedió a realizar la tinción de Gram, a continuación se observaron las colonias teñidas bajo el microscópio óptico con el objetivo de inmersión (100x), Este análisis morfológico microscópico reveló que las cuatro cepas seleccionadas eran bacilos gordos de una o dos células Gram-negativos.

Posteriormente se repitió el procedimiento de inocular las cepas puras en cinco mililitros de caldo nutritivo (Bioxon) incubandolos posteriormente a una temperatura de 32°C y por un tiempo de dos a cuatro horas. una vez transcurrido el lapso de incubación y dentro de la campana de flujo laminar se procedió de la siguiente manera, se realizó una siembra en estrías, pasando varias veces un isopo de algodón embebido en el medio nutritivo inoculado sobre la superficie del medio agar M.H. con la finalidad de inocular las placas para realizar los antibiogramas por medio de discos comerciales Gram-negativos y Gram-positivos (Bioclin). y de esta manera caracterizar la sensibilidad de las cepas cultivadas y seleccionar el antibiótico que eliminara la contaminación bacteriana de los cultivos.

El resultado de los antibiogramas realizado en las cepas obtenidas mostró el efecto de los antibióticos siguientes que a continuación se muestran en la tabla N^o 5 donde se resume su efecto en las cepas cultivadas.

	ANTIBIOTICO	EFFECTO EN LAS CEPAS CULTIVADAS.
1	Acido Nalidixilico	Intermedio. **
2	Amikacina.	Resistente. *
3	Ampicilina.	Resistente *
4	Carbencicilia.	Resistente. *
5	Cefalotina.	Resistente. *
6	Cefotaxima.	Resistente. *
7	Cloranfenicol.	Resistente. *
8	Colistina.	Resistente. *
9	Dicloxacilina.	Resistente. *
10	Eritromicina.	Resistente. *
11	Estreptomocina.	Resistente. *
12	Gentamicina.	Bactericida. ***
13	Kanamicina.	Bactericida. ***
14	Lincomicina.	Resistente. *
15	Nitrofurano.	Resistente. *
16	Penicilina.	Resistente. *
17	Tetraciclina.	Bactericida. ***
18	Trimetoprim-Sulfametoxazol.	Resistente. *

TABLA NQ 5. Efecto de los diferentes antibióticos utilizados en los antibiogramas en las cepas cultivadas.

La tinción de Gram, junto con las características coloniales de las cepas y el análisis morfológico al microscopio de las 4 cepas aisladas y cultivadas, además de la notable semejanza en la sensibilidad y resistencia a los mismos antibióticos nos permite suponer que muy probablemente se trate de la misma especie

bacteriana.

Una vez determinados los antibióticos que tuvieron mejor efecto bactericida en las cepas cultivadas, se seleccionó de entre la kanamicina, Gentamicina y la tetraciclina, a la Gentamicina, porque esta representaba las siguientes ventajas: La Gentamicina se utiliza actualmente en procedimientos rutinarios de desinfección superficial de los explantes vegetales, debido al amplio espectro de su acción bactericida. ya que tiene efecto tanto en bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, así como también sobre micoplasmas. La Gentamicina es uno de los antibióticos que se mantienen estables por un mayor número de días (5 días) en el medio de cultivo a 37°C (Shaffner 1979) esta característica hace de la Gentamicina uno de los antibióticos que tienen su actividad bactericida, por un lapso más prolongado que otros antibióticos.

Eichholts et al. (1979) reporta que el uso de un antibiótico de amplio espectro como el sulfato de Gentamicina puede llegar a ser extremadamente útil para algunos sistemas de descontaminación bacteriana in vitro siempre y cuando sea empleada en dosis inferiores a las cuales afecta la formación de brotes adventicios, Eichholts encontró que la morfogénesis en callos de Nicotiana glauca resultaba significativamente inhibida a concentraciones de Gentamicina superiores a 25 mg/l y una completa supresión de la organogénesis cuando el antibiótico fue utilizado a una dosis de 100 mg/l.

Es un hecho conocido que varios antibióticos tienen efecto hormonal en los tejidos vegetales en cultivo, tal es el caso de

las penicilinas que se sabe que tienen un efecto de auxina en los cultivos in vitro (Robles, 1985).

Es importante mencionar que no se puede generalizar categóricamente que el uso de los antibióticos resulta inconveniente o bien que resuelve indiscriminadamente los problemas de contaminación bacteriana sistémica, ya que los tejidos vegetales muestran respuestas variables de acuerdo a su genotipo frente a los antibióticos, razón por la cual la conveniencia del uso de los antibióticos debe determinarse por ensayo y error para los casos en que se justifique plenamente.

La kanamicina y la tetraciclina se descartaron para el control de la contaminación bacteriana por las siguientes razones: la tetraciclina al igual que la kanamicina son antibióticos en los que con mayor frecuencia se ha determinado tener un efecto tóxico en las células vegetales en cultivo (Pollock, 1983) además de que son difíciles de conseguir comercialmente presentaciones que se puedan administrar fácilmente en los procedimientos de desinfección bacteriana.

Por todas estas razones se implementó el siguiente procedimiento de desinfección superficial de las semillas:

- 1.-) Etanol 70 % (v/v) por 60 segundos, 2.-) Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 20% (v/v) 15 minutos en agitación constante,
- 3.-) Acido Sulfúrico concentrado (H₂SO₄) por 30 segundos,
- 4.-) Primer enjuague en agua destilada estéril, 5.-) Segundo enjuague en agua destilada estéril, 6.-) Hidratación de las semillas por 48 horas con sulfato de Gentamicina (20 mg/l) esterilizado por filtración Milipore.

Este procedimiento resultó ser el mejor de todos los

anteriormente empleados, pues redujo la contaminación significativamente ya que era generalizada (100%) a solo 7 de cada 100 (7%) unidades experimentales.

.5.2 Método de Siembra.

Después del proceso de esterilización del material biológico descrito anteriormente se procedió a la disección de los explantes la cual se realizó en el área aséptica de una campana de flujo laminar (VECO), La cual se puso a funcionar antes de limpiarla y desinfectarla. Se introdujo en la campana todo el material requerido para la siembra y la disección de los embriones, esto incluyó tubos con medio de cultivo, microscopio de disección estereoscópico, instrumental, navajas de acero inoxidable, agujas de disección, bisturí, pinzas de relojero. El instrumental se colocó en un frasco con alcohol etílico industrial al 70% (v/v), cajas de Petri esterilizadas y las semillas en tratamiento.

Una vez que el material estuvo dentro de la campana de flujo laminar se desinfectó superficialmente con alcohol etílico industrial al 70%, y posteriormente se limpió el área de sembrado con alcohol etílico industrial al 96% y se dejó secar el alcohol. una vez seco se encendió el mechero Bunsen para proporcionar una área estéril de trabajo adicional dentro de la campana de flujo laminar.

Dissección de los Explantes.

Bajo el microscopio de dissección y sobre una caja de Petri esterilizada se sujetó una semilla con las pinzas de relojero y con la navaja de acero inoxidable se realizó un corte en el primer tercio sagital longitudinal de la semilla, ya que de esta manera el corte no dañaba al embrión, posteriormente con un bisturí se presionó las cubiertas y el endospermo que rodeaba al embrión para poder aislarlo, una vez liberado el embrión se tomaba con las pinzas de relojero y se depositaba en medio de cultivo MS líquido esterilizado en autoclave con lo que se evitó desecación del embrión a la vez que se mantuvo en un medio isotónico que impidiera la plasmólisis celular.

Para la presente investigación solo se emplearon embriones aislados e íntegros en sus dos regiones meristemáticas y fueron desechados aquellos embriones que durante el proceso de dissección resultaron dañados en alguna zona meristemática ya que estas son zonas de síntesis de fitohormonas endógenas y esto se hubiera manifestado en la expresión morfológica de los embriones en cultivo, ya que un embrión desprovisto de alguno de sus meristemas se desbalancea hormonalmente así tenemos que las auxinas son sintetizadas en los ápices en desarrollo, y existen evidencias de que las citocininas se forman en las raíces y se transportan a las hojas y tallos (Bidwell, 1979; Rojas, 1979).

Antes de usar el instrumental, para cada dissección se flamearon en el mechero Bunsen y enfriaron con agua destilada estéril.

Una vez aislados y reunidos en medio MS líquido, todos los embriones de cada tratamiento se extraían con una asa de siembra bacteriológica previamente flameada y se depositó un embrión en el interior de un tubo de cultivo de 25 X 125 con 12.5 ml de medio de cultivo cada uno.

5.3 Medio de Cultivo.

El medio de cultivo utilizado fue el propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS). Para la preparación del medio de cultivo se utilizaron soluciones concentradas de sus diferentes constituyentes: macronutrientes, solución de cloruro de calcio (CaCl_2), micronutrientes, solución de hierro quelatado con Na EDTA, inositol, vitaminas y glicina, preparadas en 100 ml para 10 o 20 litros de medio de cultivo y conservados en refrigeración a 5° C hasta su utilización. En el apéndice 1 se indican los diferentes constituyentes del medio así como las cantidades de cada uno de los reactivos empleados en el medio así como en la preparación de las soluciones concentradas, se tomaron alícuotas de estas soluciones y se adicionaron a la mitad del volumen final de agua destilada, se agregó la sacarosa (30 g/l) y se mezclaron en una parrilla de agitación magnética hasta que se disolvió después de lo cual se ajustó a su volumen final, se ajustó el pH entre el rango de 5.7 y 5.8 con NaOH (0.1 y 0.5 N) y HCl (0.1 y 0.5 N).

Una vez ajustado el pH se agregó el agar y se dejó en agitación por unos minutos para que se hidratara el agar el cual se fundió posteriormente en un horno de microondas calentándolo hasta 185° F (85° C) ya que la temperatura de fusión del agar,

se encuentra en el rango de 80- 88°C, a continuación se agitó por varios minutos nuevamente para homogenizar la solución completamente.

Por último se sirvieron 100 ml de medio de cultivo en vasos de precipitado de 250 ml, se les agregó las alícuotas hormonales correspondientes al tratamiento y se mantuvieron en agitación constante por varios minutos, finalmente se repartieron los 100 ml de medio de cultivo en 8 tubos de ensayo de 25 X 125 resultando un volumen de 12.5 ml de medio de cultivo por cada tubo, todos los tubos se cubrieron con una doble capa de papel aluminio los cuales se sujetaron con ligas de hule.

El medio se esterilizó en autoclave a presión de 20 lb/pl² (1.5 kg/cm²) y una temperatura de 126° C durante 15 minutos.

Reguladores de Crecimiento

Los reguladores de crecimiento utilizados se prepararon en soluciones concentradas 1×10^{-3} M.

Las auxinas ANA y AIA, se disolvieron en etanol, se calentaron ligeramente y diluyeron gradualmente hasta aforarlos en 100 ml de agua destilada conservandose en refrigeración a 0 °C hasta ser utilizadas.

Las citocininas BA y K se disolvieron en un volumen pequeño de HCl 0.5 N calentandolo ligeramente y despues de lo cual se aforaron a 100 ml de agua destilada almacenandose también en refrigeración.

5.4 Condiciones de Cultivo.

Una vez realizada la siembra, los cultivos fueron incubados en una cámara de crecimiento a una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y un

fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, la intensidad luminosa fue de 1500 lux.

5.5 Diseño Experimental.

Se realizó un experimento factorial completamente al azar de dos variables (2^2): dos auxinas y dos citocininas con cuatro niveles (Concentraciones Micromolar [μM]) para cada factor:

Las auxinas utilizadas fueron: AIA, ANA.

Las citocininas empleadas fueron: BA y K.

Los cuatro niveles (concentraciones) de las fitohormonas empleadas fueron: 0.0, 0.1, 1.0 y 10.0 micromolar. [μM] (1×10^{-6} M).

Cada experimento completo constó de 16 tratamientos, 8 repeticiones y 128 unidades experimentales para cada barrido hormonal y 512 unidades experimentales en total para los cuatro barridos hormonales realizados.

Los fitoreguladores se utilizaron de manera que siempre estuviera involucrada una auxina con una citocinina a la vez en cada barrido hormonal, produciéndose así todas las posibles combinaciones entre los cuatro niveles de cada variable, resultando 16 tratamientos hormonales diferentes para cada barrido hormonal, de esta manera para cada tratamiento existía una proporción relativa diferente de auxina/citocinina en cada tratamiento del experimento.

Se estableció la siguiente función de respuesta:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

En donde:

$i = 1, 2, \dots, a$. i -ésima concentración de auxina.

$j = 1, 2, \dots, b$. j -ésima concentración de citocinina.

$k = 1, 2, \dots, r$. k -ésima repetición.

Y_{ijk} = Es la variable de respuesta (inducción de brotes, callos y raíces) bajo la i -ésima concentración de auxina y de la j -ésima concentración de citocinina en la k -ésima repetición.

μ = Es la media general de la función de respuesta.

α_i = Representa el efecto producido por la i -ésima concentración de auxina sobre la variable de respuesta.

β_j = Representa el efecto producido por la j -ésima concentración de citocinina sobre la variable de respuesta.

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Representa el efecto conjunto de la i -ésima concentración de auxina y de la j -ésima concentración de citocinina en la variable de respuesta.

ϵ_{ijk} = Factor de variabilidad asociado a las condiciones no controladas del experimento. (Error Experimental).

El número de repeticiones se determinó como ocho, ya que la utilización de entre cuatro a ocho repeticiones permite obtener un grado de precisión razonable (Little, 1985) consiguiéndose de esta manera el número de grados de libertad para el error (GLE) mayor que 100 en todos los análisis de varianza realizados con lo que se reduce significativamente el coeficiente de variación (De la Loma, 1966, citado por Reyes, 1980), además de que se reduce el error experimental de manera notable, e incrementamos el valor de la F calculada, dado que es posible manipular, esta cantidad aumentandola en forma directamente proporcional al número de repeticiones, ya que para

determinar este parámetro (GLE) se efectúa el producto del total del número de tratamientos por el número de repeticiones menos uno $ab(r-1)$.

Una representación esquemática de los cuatro barridos hormonales de que consistió el experimento realizado se muestra a continuación.

AUXINAS [μM]

Acido indolacético
(AIA)

Acido naftalenacético
(ANA)

[μM]

	1	2	3	4
	0.0	0.1	1.0	10.0
1				
0.0				
2				
0.1				
3				
1.0				
4				
10.0				

	5	6	7	8
	0.0	0.1	1.0	10.0

CITOCININAS

Benciladenina

Kinetina

5				
0.0				
6				
0.1				
7				
1.0				
8				
10.0				

5.6 Evaluación de las Variables Dependientes.

Dado que el objeto de esta investigación es analizar el efecto morfogénico de los diferentes tratamientos hormonales, los parámetros cuantificados son la formación de callo, raíces y brotes.

Callo.

El crecimiento de callo en los tratamientos hormonales en los cuales se presentó, se evaluó cuantificando los dos parámetros que mejor caracterizan su crecimiento, estos fueron: peso fresco y el peso seco, para cuantificar el peso fresco se pesaron en una balanza analítica los callos sobre un trozo de papel aluminio de peso previamente conocido. Para conocer el peso real se obtuvo la diferencia del trozo de aluminio con el callo y el pedazo de aluminio solo, para determinar el valor de peso seco se utilizó el mismo callo del que se obtuvo el peso fresco, el callo se dejó secar en una estufa a 60 °C y se pesó a las 48 horas que fue cuando mostró un valor constante, considerándose tal valor como el peso seco.

La presencia de callo se manifestó en el mismo explante ya sea como callo solo o bien junto con raíces y/o brotes. Para la cuantificación del callo se separaron de éste la raíces y/o brotes que estuvieran presentes de manera que se pudiera cuantificar el callo solo.

Raíces.

La rizogénesis se cuantificó determinando el número de raíces por explante en los casos en los que se presentó.

Brotos

Para determinar la magnitud de este parámetro se cuantificaron el número de brotes adventicios incluyendo el brote generado por el meristemo apical, fueron considerados como brotes las formas que tenían al menos dos pares de hojas, que de manera general medían 5.00 mm. No se cuantificaron las yemas que se presentaban como puntos activos de crecimiento y que mostraban primordios foliares diferenciados, pero que se mantuvieron en ese estado todo el tiempo que duró el experimento, seguramente inhibidos por la dominancia apical que ejercían los brotes principales.

Para la construcción de las gráficas de los diferentes parámetros morfogénéticos evaluados se consideró la media aritmética de sus valores determinados de la manera anteriormente descrita.*

* El vacío o llenado en las barras de las gráficas no tiene ningún significado en particular y solo se utilizan para diferenciar una fila de barras de otra.

5.7 Evaluación Estadística.

La respuesta morfogenética de los embriones cigóticos de Datura stramonium, bajo la influencia de las combinaciones hormonales de dos auxinas y de dos citocininas fueron evaluados de la manera anteriormente descritos en el apartado 5.6 y como se estableció en la sección 5.5 se realizó para cada uno de los parámetros evaluados un análisis de varianza bifactorial mediante el paquete estadístico SPSS instalado en el equipo Burroughs B6000 de la Dirección General de Servicios de Cómputo Académico (D.G.S.C.A) de la U.N.A.M. Los cuales revelaron que para la mayoría de los casos existían varias discrepancias entre los resultados del análisis de varianza y los supuestos fundamentales sobre los que se basa este, ya que cuando se realiza este análisis se debe presuponer:

- i.-) Que las varianzas de las diferentes muestras son homogéneas.
- ii.-) Que las varianzas y las medias de las distintas muestras no están correlacionadas.
- iii.-) Que los efectos principales son aditivos. (Reyes, 1980; Little, 1985.)

Sin embargo después de realizar el análisis de varianza se encontró frecuentemente que los datos violaban simultáneamente estas tres suposiciones. Cuando existen este tipo de irregularidades en las reglas fundamentales del análisis de varianza es necesario realizar una transformación logarítmica, angular (arco-seno) o de raíz cuadrada, se examinó individualmente cada uno de los 16 análisis de varianza

realizados y se practicó la transformación conveniente a cada caso según el siguiente criterio:

Transformación Logarítmica Siempre que se tuvieron datos en los que la desviación estándar de las muestras fueran proporcionales a las medias, además de que los efectos debidos al tratamiento resultaron multiplicativos en vez de aditivos se aplicó la transformación logarítmica de los datos, realizando nuevamente el análisis de varianza, utilizando esta vez los logaritmos de los datos obtenidos. (Reyes, 1980; Little, 1985).

Transformación de la Raíz Cuadrada Cuando los datos tienden a mostrar una distribución de Poisson, es posible aplicar los métodos estadísticos que se utilizan en poblaciones con distribución normal a las distribuciones binomiales o de Poisson si a los valores originales se les elimina la asimetría característica de esta distribución con la extracción de la raíz cuadrada de los valores observados. Los casos que presentaron este tipo de distribución pudieron ser identificados si su desviación estándar tiende a ser igual a la media general, es decir, si $\sigma^2 = \mu$ (Reyes, 1980; Snedecor, 1981).

Transformación Angular o de Arco-Seno. No se encontró ningún caso en que las medias y la desviación estándar mostraran una relación que hiciera necesario este tipo de transformación.

Después de efectuadas estas manipulaciones estadísticas de los datos, las pruebas de homogeneidad de varianzas mostraron una mayor semejanza entre ellas ya que en ningún caso la relación de la varianza mayor entre la varianza menor resultó ser mayor que 0.645, mientras que en los datos sin transformar, la

heterogeneidad de las varianzas era significativamente mayor ya que la relación varianza mayor/varianza menor alcanzó un valor de hasta 17.49, lo que provoca que bajo estas circunstancias el análisis de varianza pierda sensibilidad para detectar diferencias significativas entre los tratamientos debido a los factores a que fueron sometidos.

En los 16 análisis de varianza realizados se encontraron diferencias significativas debidas al tratamiento. (ver tabla N° 6) posteriormente se procedió a determinar los mejores tratamientos estadísticamente significativos para cada parámetro morfogénético evaluado, mediante análisis múltiples de separación de medias como las pruebas de Tukey y Duncan, al nivel de confianza de 5%.

A continuación se muestra para cada parámetro cuantificado y para cada uno de los barridos hormonales efectuados los resultados y discusión así como una gráfica al pie de la cual se indica si el análisis de varianza de los datos originales necesitaron de una transformación logarítmica o de raíz cuadrada, así mismo se indica si existieron diferencias significativas debidas al tratamiento y el nivel de confianza en el cual ocurrieron ya sea en alguno de los factores por separado (auxina ó citocinina) así como las interacciones de estas (auxina con citocinina), también se indica de acuerdo a las pruebas de Duncan y Tukey al nivel de confianza de 5.0 % cuales combinaciones fueron las mejores para inducir los efectos morfogénéticos deseados, utilizandose la siguiente notación:

Notación	Nivel de confianza Probabilidad de F P(F)	%	Nivel de Significancia
N.S.	> 0.005	>5%	No Significativo.
*	< 0.005	<5%	Significativo.
**	< 0.001	<1%	Muy Significativo
***	< 0.0001	<0.1%	Altamente Significativo

Cuadro de decisión para los diferentes intervalos de probabilidad de F utilizados para establecer los diferentes niveles de significancia.

Combinación Hormonal	Parámetro Evaluado.	Probabilidad de F Y de Significancia.	Grado	Transformación Empleada.
AIA/BA	1 Callo Peso Seco.	AIA. 0.000	***	Logarítmica.
		BA. 0.000	***	
		Interacción 0.000	***	
ANA/BA	2 Callo Peso Seco.	ANA. 0.000	***	Ninguna.
		BA. 0.000	***	
		Interacción 0.000	***	
ANA/K	3 Callo Peso Seco.	ANA 0.000	***	Ninguna.
		K 0.002	*	
		Interacción 0.005	*	
AIA/K	4 Callo Peso Seco.	AIA 0.000	***	Logarítmica.
		K 0.000	***	
		Interacción 0.002	*	
AIA/BA	5 Callo Peso Fresco.	AIA 0.000	***	Logarítmica.
		BA 0.000	***	
		Interacción 0.000	***	
ANA/BA	6 Callo Peso Fresco.	ANA 0.000	***	Raíz Cuadrada
		BA 0.000	***	
		Interacción 0.000	***	
ANA/K	7 Callo Peso Fresco	ANA 0.000	***	Ninguna.
		K 0.000	***	
		Interacción 0.000	***	
AIA/K	8 Callo Peso Fresco	AIA 0.000	***	Logarítmica.
		K 0.000	***	
		Interacción 0.000	***	

Tabla Nº 6 Resumen de valores de la Probabilidad de F y su grado de significancia para cada uno de los parámetros evaluados en los 16 barridos hormonales realizados.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla Nº 6 (Continuación).

Combinación Hormonal	Parámetro Evaluado.	Probabilidad de F Y Grado de Significancia.	Grado de Significancia.	Transformación Empleada.
AIA/BA	9 Número de Brotes.	AIA. 0.038 BA. 0.000 Interacción 0.009	N.S. *** N.S.	Raíz cuadrada
ANA/BA	10 Número de Brotes.	ANA. 0.000 BA. 0.000 Interacción 0.000	*** *** ***	Logarítmica.
ANA/K	11 Número de Brotes.	ANA 0.000 K 0.000 Interacción. 0.000	*** *** ***	Raíz Cuadrada
AIA/K	12 Número de Brotes.	AIA 0.000 K 0.988 Interacción. 0.000	*** N.S. ***	Raíz Cuadrada
AIA/BA	13 Número de Raíces.	AIA 0.117 BA 0.005 Interacción 0.049	N.S. * N.S.	Raíz Cuadrada
ANA/BA	14 Número de Raíces.	ANA 0.000 BA 0.000 Interacción. 0.021	*** *** N.S.	Ninguna.
ANA/K	15 Número de Raíces.	ANA 0.000 K 0.490 Interacción. 0.000	*** *** ***	Logarítmica.
AIA/K	16 Número de Raíces.	AIA 0.012 K 0.002 Interacción. 0.211	N.S. * N.S.	Raíz Cuadrada

Tabla Nº 6 Resumen de valores de la Probabilidad de F y su grado de significancia para cada uno de los parámetros evaluados en los 16 barridos hormonales realizados.

6.0 RESULTADOS Y DISCUSION.

Callo Peso Seco.

En la gráfica N° 1 se puede apreciar en los cuatro barridos hormonales efectuados la callogénesis evaluada en peso seco (gramos). Así como también muestra claramente que son las auxinas los reguladores del crecimiento que determinan principalmente el efecto callogenético y que de estos es el ácido naftalenacético (ANA) la auxina más callogénica, en comparación al efecto callogenético de la auxina ácido indolacético (AIA).

De manera general es posible mencionar que los tratamientos en los cuales se obtuvo formación significativa de callo fueron principalmente aquellos en que la concentración Auxina y/o Citocinina era de 10.0 μM . El mejor tratamiento para incrementar el peso seco resultó ser 1.0 μM de algunas de las fitohormonas (gráfica 2) o bien que las dosis 10.0 y 1.0 μM de los reguladores de crecimiento utilizados produjera en los tratamientos efectos callogenéticos estadísticamente iguales entre sí (gráficas 2, 3, y 4).

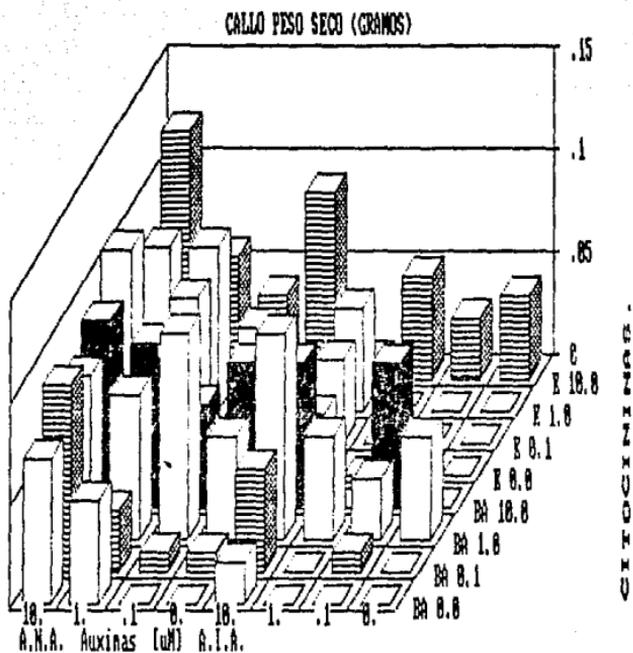
En la gráfica 8 se muestra en un histograma de frecuencia la ocurrencia del callo (%) en los diferentes tratamientos de las dos auxinas utilizadas y resulta notable el hecho de que el 69% del callo evaluado en peso seco se presente en los tratamientos con ANA, mientras que solo el 31% del callo se presenta en los tratamientos con AIA.

El efecto de las auxinas AIA/ANA en la callogénesis (peso seco) resultó altamente significativo (***) en los cuatro barridos hormonales con una probabilidad de F $P(F)=0.000$

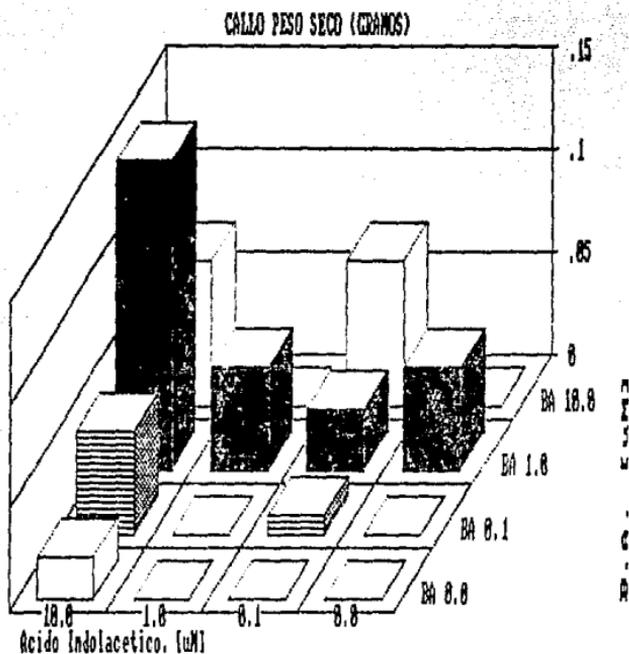
(gráficas 2,3,4. y 5). Por otro lado, entre las dos citocininas empleadas existieron diferencias notables en su efecto callogenético ya que el callo generado por los tratamientos donde se utilizó la citocinina BA es el 57% del callo y la cinetina (K) el 43% del total del callo (Peso Seco, gráfica 7). Es significativo el hecho de que la auxina ANA (Gráfica N° 6) y la citocinina BA (Gráfica N° 7), consideradas ambas como las hormonas más callogénicas cuando se utilizaron simultaneamente produjeron la combinación hormonal mas callogénica de todas (Gráfica N°3), y por el contrario, las hormonas menos callogénica AIA,K (Gráficas 6 y 7) al ser empleadas en combinación generaron el barrido hormonal menos callogénico de todos los evaluados (Gráfica 5).

El efecto callogénico de las citocininas resultó altamente significativo (***) a un nivel de confianza de menos de 0.1 % $P(F)=0.000$ (gráficas 2,3 y 5) excepto en la combinación hormonal ANA/K donde el efecto de la cinetina resultó significativo (*) con una $P(F)=0.002$ (gráfica 4). Es importante mencionar que se presentaron dos casos manifiestos de efecto sinérgico notable entre auxina y citocinina en la callogénesis (peso seco) (gráfica 2 10.0 μM AIA y 1.0 μM BA) y 10.0 μM ANA y 10.0 μM K , (Gráfica N°7) mientras que en los demás casos aunque las interacciones fueron significativas no hubo efecto sinérgico en la callogénesis (peso seco).

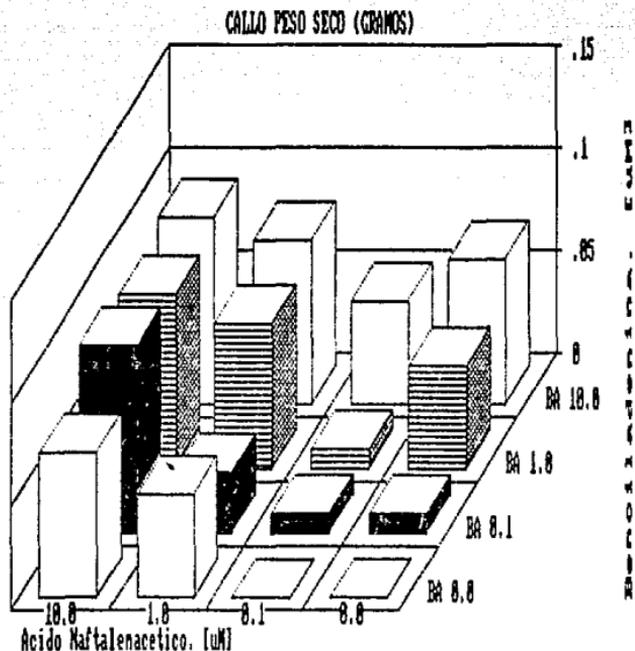
El efecto de la interacción Auxina/Citocinina resultó altamente significativo (***) $P(F)=0.000$ en las combinaciones hormonales AIA/BA y ANA/BA (gráficas 2 y 3), mientras que en las combinaciones BA/K y AIA/K las diferencias resultaron significativas (*) con $P(F)=0.005$ y $P(F)=0.002$ respectivamente.



Gráfica Nº 1. Callo peso seco (gr.) (AIA,ANA/BA,K)



Gráfica Nº 2. Callo Peso Seco (gr.) (AIA/BA)
 Tipo de Transformación Empleada: Logarítmica.
 Efecto de la Auxina(AIA): Altamente Significativa (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 Efecto de la Citocinina(BA): Altamente Significativa (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 Efecto de la Interacción:
 Auxina (AIA)/Citocinina(BA): Altamente Significativa (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 i) Prueba de Tukey al Nivel de Confianza de 5.0 %
 Mejor Tratamiento Para la Auxina (AIA): 10.0 [μM]
 Mejor Tratamiento Para la Citocinina BA 1.0 Y 10.0 [μM]
 ii) Prueba de Duncan al Nivel de confianza de 5.0 %
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (AIA Vs. Callo Peso Seco.)
 Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas=0.398
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 3.868
 Mejor tratamiento Para de Auxina AIA 10.0 [μM].
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (BA Vs. Callo Peso Seco)
 Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas=0.404
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima=5.503
 Mejor tratamiento de Citocinina BA 1.0 [μM].



Gráfica N° 3. Callo Peso Seco. (ANA/BA)

Tipo de Transformación Empleada: Ninguna.

Efecto de la Auxina (ANA): Altamente Significativa (***)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F) = 0.000

Efecto de la Citocinina (BA) Altamente significativa (***)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F) = 0.000

Efecto de la Interacción:

Auxina (ANA)/Citocinina(BA): Altamente significativa (***)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F) = 0.000

i) Prueba de Tukey al Nivel de Confianza de 5.0 %

Mejor Tratamiento Para la Auxina ANA 1.0 y 10.0 [µM]

Mejor Tratamiento Para la Citocinina BA 1.0 y 10.0 [µM]

ii) Prueba de Duncan al Nivel de confianza de 5.0 %

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (ANA vs. Callo Peso Seco)

Prueba de Cochran. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.486

Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 3.609

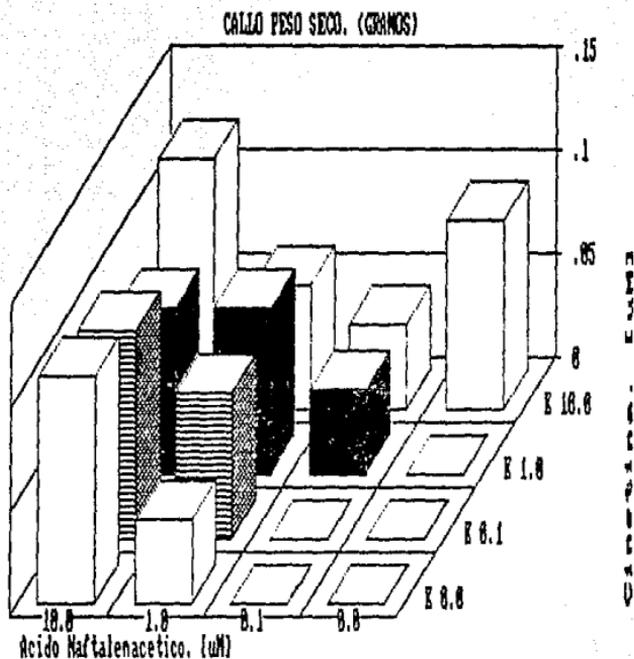
Mejor tratamiento Para de Auxina ANA 10.0 [µM].

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (BA Vs. Callo Peso Seco)

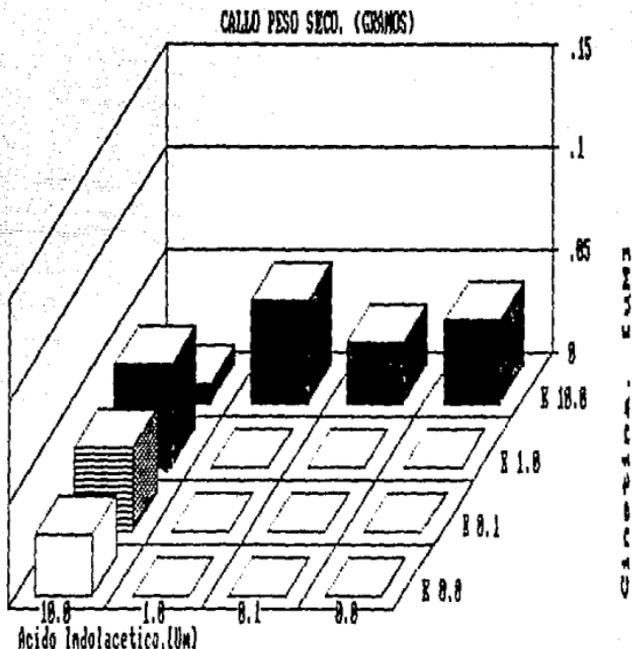
Prueba de Cochran. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.314

Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 3.202

Mejor tratamiento de Citocinina BA 1.0 y 10.0 [µM]

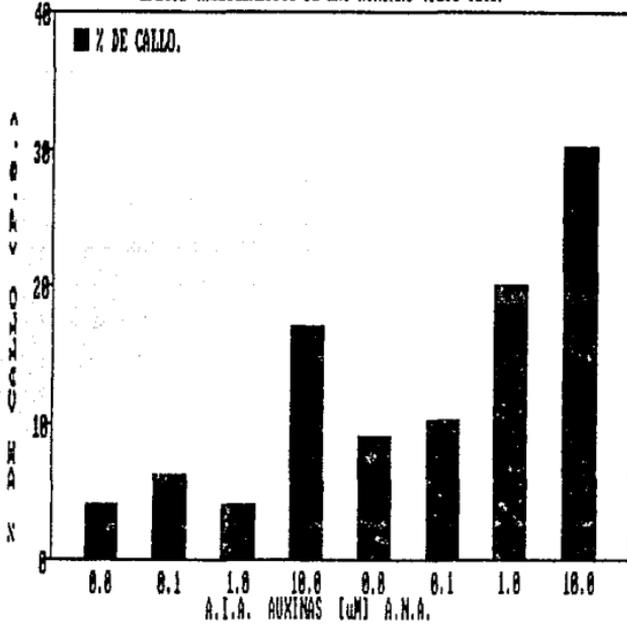


Gráfica Nº 4. Callo Peso Seco. (ANA/ K)
 Tipo de Transformación Empleada: Ninguna.
 Efecto de la Auxina (ANA) Altamente Significativa (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 Efecto de la Citocinina (K.) Significativo (*)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.002
 Efecto de la Interacción:
 Auxina (ANA)/Citocinina(K.) Significativo (*)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.005
 i) Prueba de Tukey al Nivel de Confianza de 5.0 %
 Mejor Tratamiento Para la Auxina ANA: 10.0 μM
 Mejor Tratamiento Para la Citocinina K.: 10.0 μM
 ii) Prueba de Duncan al Nivel de confianza de 5.0 %
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (ANA Vs. Callo Peso Seco)
 Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.370
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 4.154
 Mejor tratamiento Para de Auxina ANA 10.0 μM .
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (K. Vs. Callo Peso Seco).
 Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.303
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 1.495
 Mejor tratamiento de Citocinina K. 1.0 y 10.0 μM .



Gráfica No 5. Callo Peso Seco. (AIA/K)
 Tipo de Transformación Empleada: Logaritmica
 Efecto de la Auxina (AIA): Altamente Significativa. (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F) = 0.000
 Efecto de la Citocinina (K.) Altamente Significativa. (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F) = 0.000
 Efecto de la Interacción:
 Auxina (AIA)/Citocinina(K) Significativa. (*)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F) = 0.002
 i) Prueba de Tukey al Nivel de Confianza de 5.0 %
 Mejor Tratamiento Para la Auxina AIA 10.0 [μM].
 Mejor Tratamiento Para la Citocinina K 10.0 [μM].
 ii) Prueba de Duncan al Nivel de confianza de 5.0 %
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (AIA Vs. Callo Peso Seco).
 Prueba de Cochran. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.365
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 2.260
 Mejor tratamiento Para de Auxina: AIA 10.0 [μM].
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (K Vs. Callo Peso Seco)
 Prueba de Cochran. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.329
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 1.929
 Mejor tratamiento de Citocinina K 10.0 [μM].

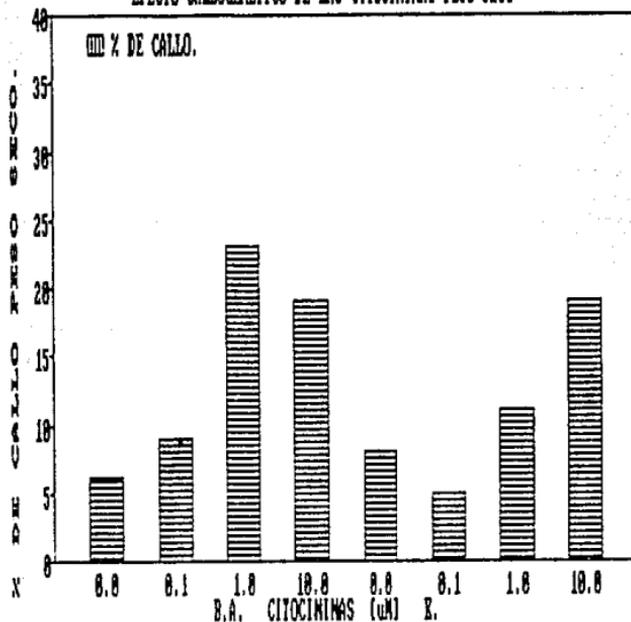
EFFECTO CALLOGENETICO DE LAS AUXINAS (PESEO SECO)



Gráfica Nº 6. Efecto callogénico de las Auxinas (AIA/ANA) (Callo Peso Seco.)

AUXINA.	% PARCIAL DE CALLO.	[µM]	% DE CALLO POR TRATAMIENTO.
AIA.	31 %	0.0	4 %
		0.1	6 %
		1.0	4 %
		10.0	17 %
ANA.	69 %	0.0	9 %
		0.1	10 %
		1.0	20 %
		10.0	30 %

EFFECTO CALLOGENETICO DE LAS CITOCININAS PESO SECO



Gráfica Nº 7. Efecto Callogénico de las Citocininas (BA./K.)
(Callo Peso Seco.)

CITOCININA.	% PARCIAL DE CALLO.	[µM]	% DE CALLO POR TRATAMIENTO.
BA.	57 %	0.0	6 %
		0.1	9 %
		1.0	23 %
		10.0	19 %
K.	43 %	0.0	8 %
		0.1	5 %
		1.0	11 %
		10.0	19 %

Callo Peso Fresco.

La Gráfica número 8 muestra de manera general la callogénesis evaluada en peso fresco en los cuatro barridos hormonales realizados, en la cual se puede apreciar que en los tratamientos en los que ocurre la mayor formación significativa de callo son siempre aquellos en los que se utilizó la dosis más alta (10.0 μM) de las auxinas AIA, ANA y las citocininas BA, K. Esta Gráfica muestra el notable efecto callogénico de la auxina ANA ya que en sus diferentes tratamientos ocurre el mayor porcentaje de callo (71%), mientras que el efecto callogénico de la auxina AIA es notablemente inferior.

La auxina con mejor efecto callogénico fue ANA. Pues la frecuencia de callo (Peso Fresco) generado en los tratamientos con ANA es significativamente mayor (71 %) (Gráfica 13), en cambio, la auxina AIA fue la hormona con un menor efecto callogénico pues en todos sus tratamientos solamente se presentó el 29 % del callo evaluado en peso fresco (Gráfica 13).

En todas las combinaciones hormonales en las que se utilizaron las auxinas AIA y ANA, el mejor tratamiento callogénico observado de acuerdo a las pruebas de Duncan y Tukey al nivel de 5 % fue 10.0 μM (Gráficas 9,10,11 y 12).

De todas las citocininas empleadas la más callogénica (peso fresco) fué BA, ya que generó el 63 % de callo, mientras que en los tratamientos con K solamente ocurrió el 37 % del total del callo evaluado en peso fresco (Gráfica 14).

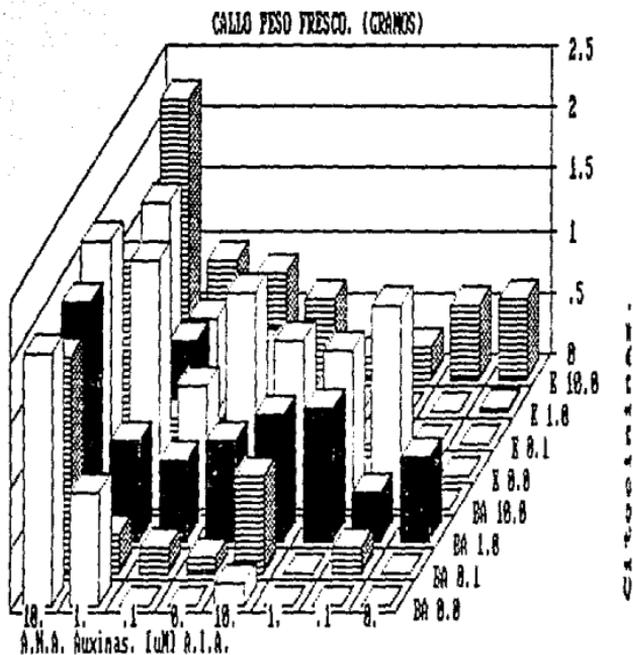
La prueba de Duncan para la citocinina BA. Indica que el mejor tratamiento fue 10.0 μM para la combinación AIA/BA

(Gráfica 9) Mientras que para la combinación ANA/BA los tratamientos más callogénicos fueron 1.0 y 10.0 [μ M] sin diferencias significativas entre ellas (Gráfica 10). La prueba de Tukey para la misma hormona muestra como el mejor tratamiento a la concentración 10.0 [μ M] en la combinación AIA/BA (Gráfica 9). Mientras que para la combinación hormonal ANA/BA las concentraciones 0.1, 1.0 y 10.0 [μ M] sin diferencias significativas entre ellas produjeron el mismo efecto callogénico (Gráfica 10).

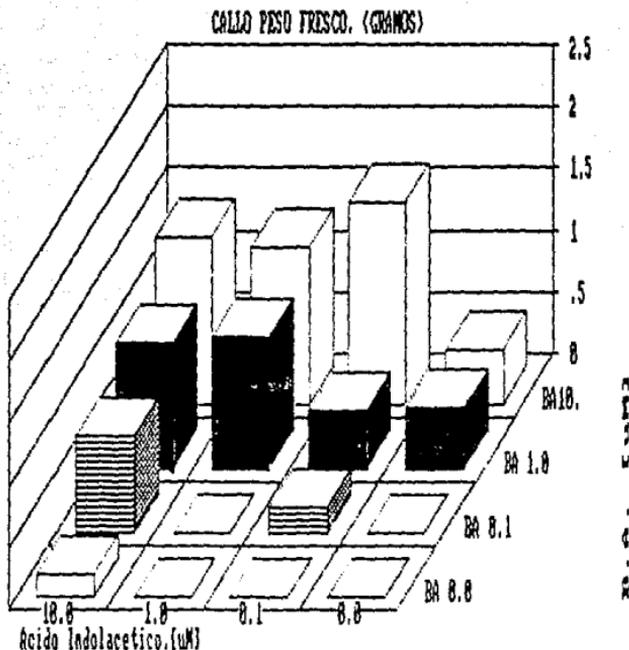
Los tratamientos óptimos para la callogénesis (peso fresco) promovidos por la citocinina K, resultaron ser 1.0 y 10.0 [μ M] según la prueba de tukey y 10.0 [μ M] según Duncan para la combinación ANA/K (Gráfica 11). Para la combinación AIA/K el tratamiento más callogenético fue 10.0 [μ M] de acuerdo a las pruebas de Duncan y de Tukey (Gráfica 12).

La interacción auxina/citocinina en la callogénesis (peso fresco) tuvo un efecto sinérgico notable, pues, en tres de las cuatro combinaciones hormonales los mejores tratamientos de cada barrido hormonal resultaron ser aquellos en los cuales se utilizó una auxina en combinación con una citocinina (Gráficas 9, 10 y 11) excepto la combinación hormonal AIA/K en la que la interacción resultó antagónica para la callogénesis (Gráfica 12).

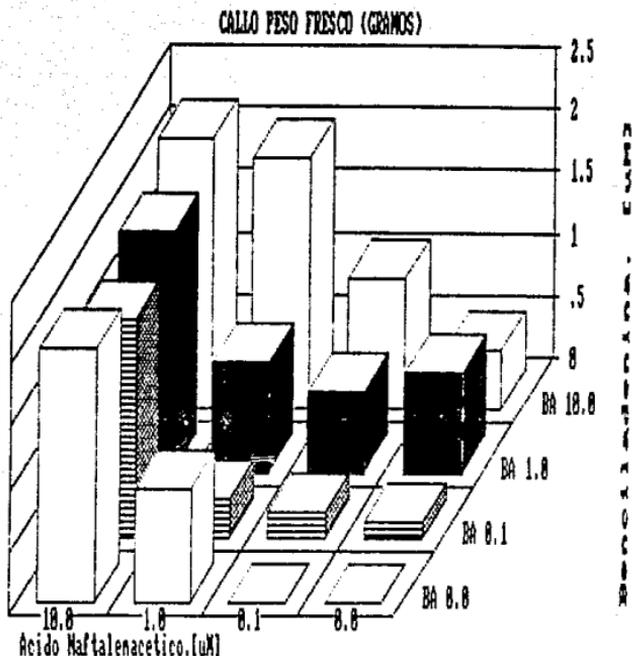
En los cuatro barridos hormonales realizados en los que se evaluó la callogénesis (peso fresco) se encontraron diferencias altamente significativas (***) $P(F) = 0.000$ para el efecto de las Auxinas AIA, ANA y las Citocininas BA, K. Así como todas las interacciones entre estas. (Gráficas 9, 10, 11 y 12).



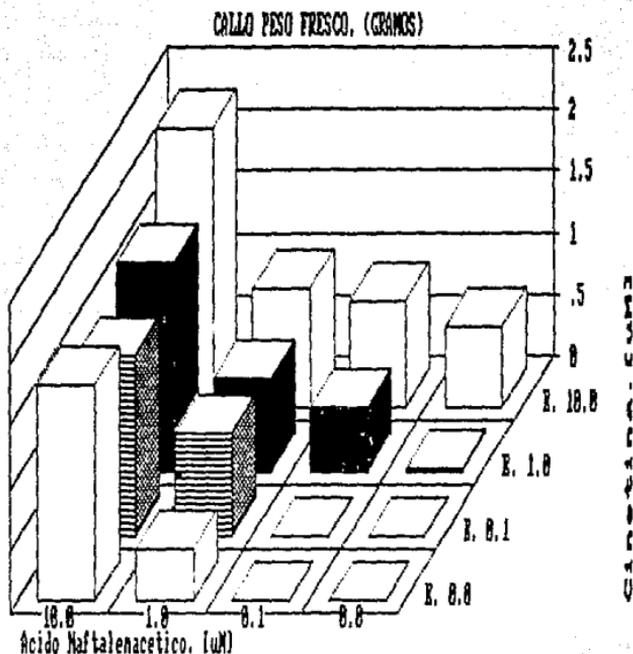
Gráfica No 8. Callo Peso fresco, (Gr.) (ANA, AIA/BA, K).



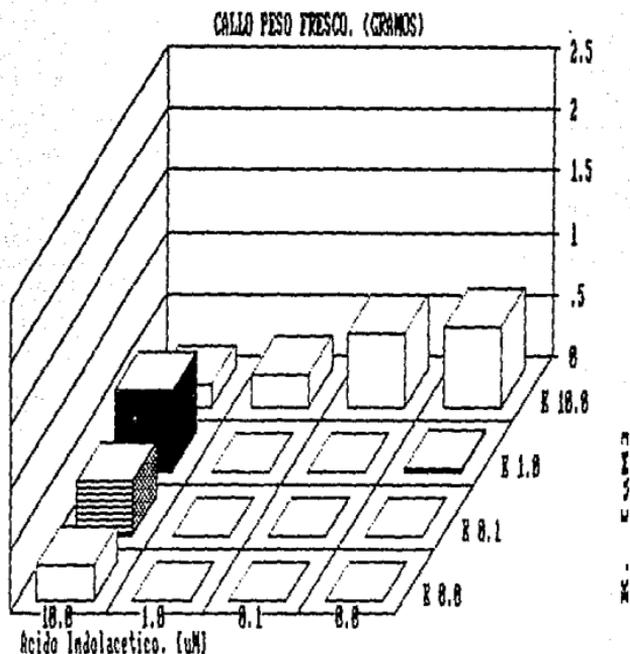
Gráfica No 9. Callo Peso Fresco. (AIA/BA).
 Tipo de Transformación Empleada : Logarítmica.
 Efecto de la Auxina (AIA): Altamente significativa.
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000 (***)
 Efecto de la Citocinina (BA.): Altamente Significativo.(***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 Efecto de la Interacción:
 Auxina (AIA)/Citocinina (BA): Altamente significativo. (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 i) Prueba de Tukey al Nivel de Confianza de 5.0 %
 Mejor Tratamiento Para la Auxina AIA.: 10.0 [μM]
 Mejor Tratamiento Para la Citocinina BA.: 10.0 [μM].
 ii) Prueba de Duncan al Nivel de confianza de 5.0 %
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (AIA. Vs Callo Peso Fresco)
 Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.555
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 32.54
 Mejor tratamiento Para de Auxina AIA.: 10.0 [μM]
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (BA. Vs. Callo Peso Fresco)
 Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.479
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 5.722
 Mejor tratamiento de Citocinina BA.: 10.0 [μM].



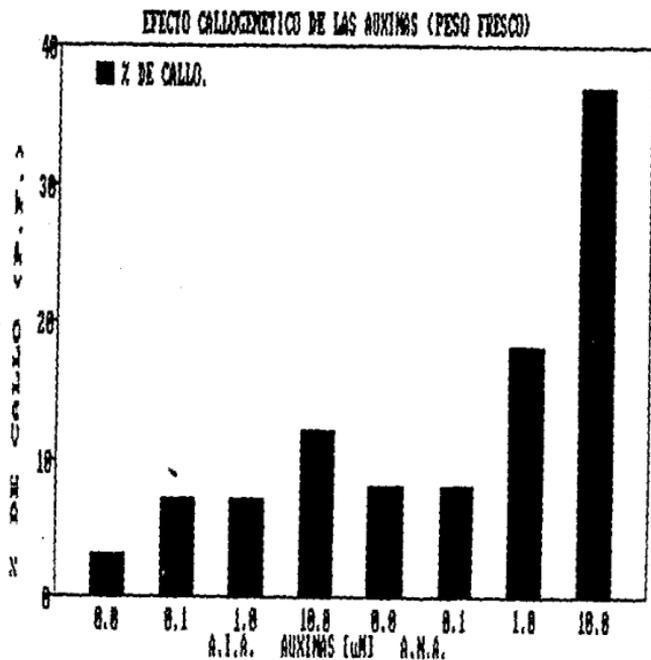
Gráfica Nº 10. Callo Peso Fresco. (ANA/BA).
 Tipo de Transformación Empleada : Raíz Cuadrada.
 Efecto de la Auxina (ANA): Altamente Significativa (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 Efecto de la Citocinina (BA) : Altamente Significativo (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 Efecto de la Interacción:
 Auxina (ANA)/Citocinina(BA) Altamente Significativo (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 i) Prueba de Tukey al Nivel de Confianza de 5.0 %
 Mejor Tratamiento Para la Auxina ANA.: 10.0 [μM]
 Mejor Tratamiento Para la Citocinina BA. 0.1,1.0 y 10.0 [μM]
 ii) Prueba de Duncan al Nivel de confianza de 5.0 %
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (ANA Vs.Callo Peso Fresco)
 Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.483
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 5.146
 Mejor tratamiento Para de Auxina ANA. 10.0 [μM].
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (BA. Vs. Callo Peso Fresco.)
 Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.336
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 4.197
 Mejor tratamiento de Citocinina BA. 10.0 [μM].



Gráfica Nº 11. Callo Peso Fresco. (ANA./K.).
 Tipo de Transformación Empleada : Ninguna.
 Efecto de la Auxina (ANA): Altamente Significativa. (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 Efecto de la Citocinina (K.): Altamente Significativa. (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 Efecto de la Interacción:
 Auxina (ANA)/Citocinina(K): Altamente Significativa. (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 i) Prueba de Tukey al Nivel de Confianza de 5.0 %
 Mejor Tratamiento Para la Auxina ANA: 10.0 [μM]
 Mejor Tratamiento Para la Citocinina K.: 1.0 y 10.0 [μM]
 ii) Prueba de Duncan al Nivel de confianza de 5.0 %
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (ANA Vs. Callo Peso Seco).
 Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.386
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 4.467
 Mejor tratamiento Para la Auxina: ANA 10.0 [μM]
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (K Vs. Callo Peso Fresco).
 Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.280
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 1.500
 Mejor tratamiento de Citocinina K. 10.0 [μM]

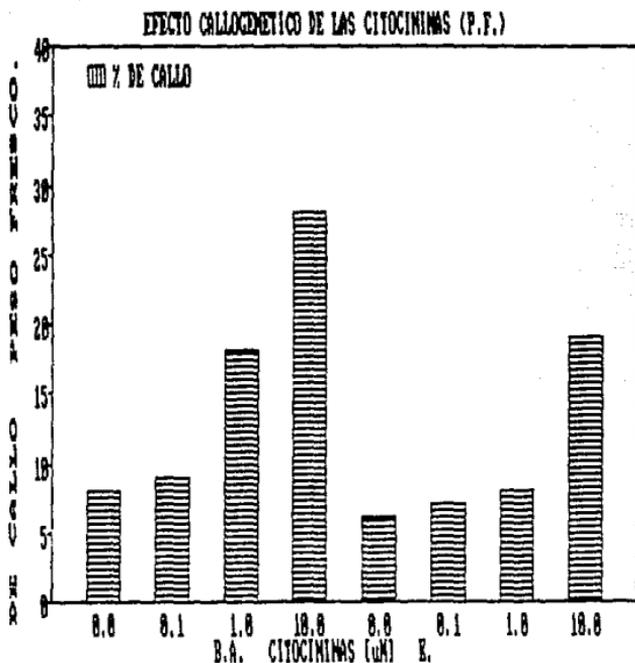


Gráfica Nº 12. Callo Peso Fresco. (AIA./K.).
 Tipo de Transformación Empleada : Logarítmica.
 Efecto de la Auxina (AIA.): Altamente Significativa. (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 Efecto de la Citocinina (K.) : Altamente Significativa. (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 Efecto de la Interacción:
 Auxina (AIA)/Citocinina(K): Altamente Significativa.:(***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 i) Prueba de Tukey al Nivel de Confianza de 5.0 %
 Mejor Tratamiento Para la Auxina AIA:10.0 [μM]
 Mejor Tratamiento Para la Citocinina K 10.0 [μM]
 ii) Prueba de Duncan al Nivel de confianza de 5.0 %
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (AIA Vs.Callo Peso Seco.)
 Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.573
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 6.339
 Mejor tratamiento Para de Auxina AIA:10.0 [μM]
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (K. Vs. Callo Peso Seco.)
 Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.489
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 3.795
 Mejor tratamiento de Citocinina K 10.0 [μM]



Gráfica N° 13. Efecto Callogénico de las Auxinas (AIA,ANA)
(Callo Peso Fresco.)

AUXINA	% PARCIAL DE CALLO.	[µM]	% DE CALLOGENESIS POR TRATAMIENTO.
AIA.	29 %	0.0	3 %
		0.1	7 %
		1.0	7 %
		10.0	12 %
ANA.	71 %	0.0	8 %
		0.1	8 %
		1.0	18 %
		10.0	37 %



Gráfica Nº 14. Efecto Callogénico de las Citocininas (BA,K)
Callo Peso Fresco.

CITOCININA	% PARCIAL DE CALLO.	[μ M]	% DE CALLOGENESIS POR TRATAMIENTO.
BA.	63 %	0.0	8 %
		0.1	9 %
		1.0	18 %
		10.0	28 %
K.	37 %	0.0	6 %
		0.1	7 %
		1.0	8 %
		10.0	16 %

Caulogénesis.

La gráfica número 15 muestra la caulogénesis observada en los cuatro barridos hormonales realizados. Resulta significativo el hecho de que en todas las combinaciones auxina/citocinina los mejores tratamientos con mayor número de brotes adventicios por explante fueron aquellos en los que la dosis de citocininas (BA, K) fue de 10.0 μM . Se presentaron dos casos manifiestos de inhibición debido a la interacción auxina/citocinina en los que el mejor tratamiento de ese barrido hormonal se presentó en la dosis más alta de las citocininas K, BA 10.0 μM siempre en ausencia de las auxinas AIA, ANA 0.0 μM .

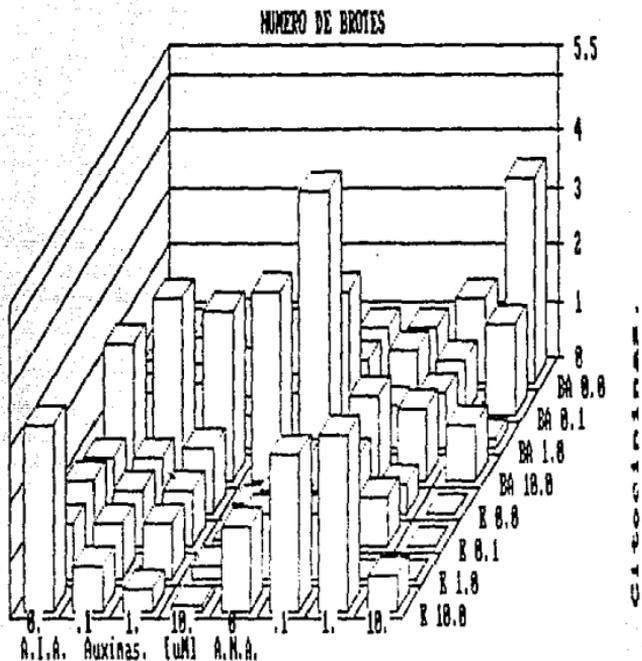
En la gráfica 20 se puede ver que para las concentraciones crecientes de las auxinas existe la tendencia a inhibir la caulogénesis. Para cada auxina empleada, los tratamientos que permitieron un porcentaje mayor de brotación múltiple fueron aquellos en los que no se utilizó auxina alguna.

El efecto caulogenético de las auxinas produjo diferencias altamente significativas (***) $P(F) = 0.000$ en tres de los cuatro barridos hormonales efectuados (Gráficas 17, 18 y 19). En la combinación AIA/BA el efecto de la auxina AIA resultó no significativo (N.S.) con una $P(F) = 0.038$ (Gráfica 16)

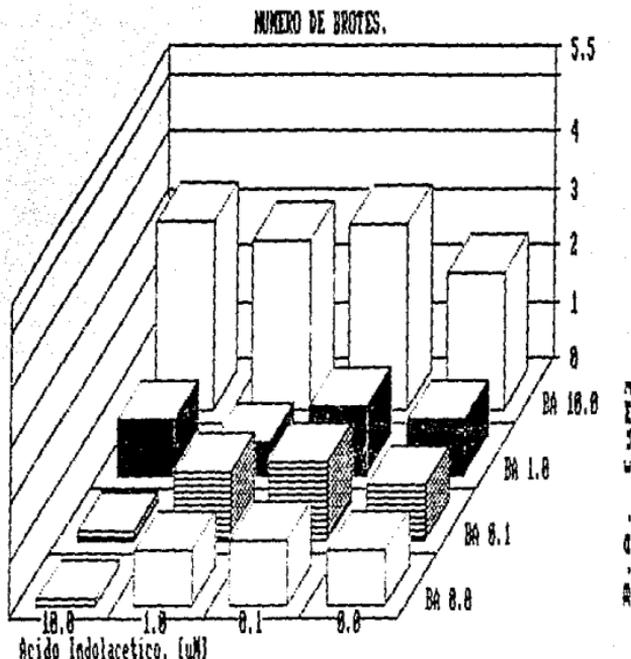
El efecto de las citocininas en la generación de brotaciones múltiples fue altamente significativo (***) $P(F) = 0.000$ en tres de las cuatro combinaciones. En el barrido hormonal AIA/K no se presentaron diferencias significativas debidas al tratamiento $P(F) = 0.988$. El tratamiento para ambas citocininas con mayor efecto caulogenético resultó ser 10.0 μM de acuerdo a las

pruebas de Duncan y Tukey. (Gráficas 16,17,18 y 19). La citocinina que se caracterizó por su mejor efecto morfogénico fue BA, pues generó el 62 % del total de los brotes cuantificados (Gráfica 21), mientras que solamente el 38 % de la caulogénesis se formó bajo los efectos de la cinetina K (Gráfica 21).

La interacción Auxina/Citocinina resultó sin diferencias significativas (N.S.) para la Auxina AIA en combinación con la citocinina BA $P(F) = 0.009$ y altamente significativa (***) para las otras tres combinaciones restantes (Gráficas 17,18 y 19). Cuando ocurrió interacción Auxina/Citocinina esta tuvo un efecto negativo ya que de manera general resultó inhibitorio de la Caulogénesis,



Gráfica Nº 15. Numero de Brotes AIA,ANA/BA,K.



Gráfica Nº 16. Numero de Brotes. (AIA/BA).

Tipo de Transformación Empleada : Raíz Cuadrada.

Efecto de la Auxina (AIA): No Significativo. (N.S.)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.038

Efecto de la Citocinina (BA): Altamente Significativo.(***)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000

Efecto de la Interacción:

Auxina (AIA)/Citocinina(BA): No Significativo (N.S.)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.009

i) Prueba de Tukey al Nivel de Confianza de 5.0 %

Mejor Tratamiento Para la Auxina: AIA Sin diferencias al 5%

Mejor Tratamiento Para la Citocinina : BA 10.0 [µM]

ii) Prueba de Duncan al Nivel de confianza de 5.0 %

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (AIA Vs. Número de Brotes)

Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.145

Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 9.626

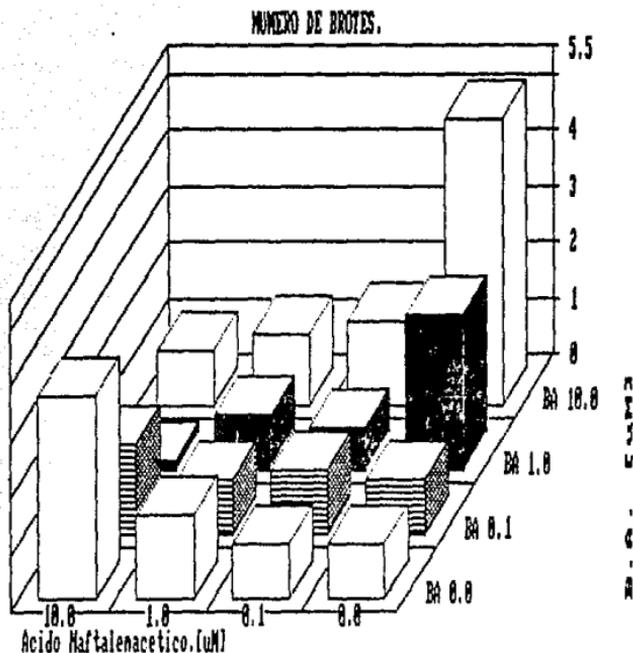
Mejor tratamiento Para de Auxina AIA Sin diferencias al 5 %

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (BA Vs. Numero de Brotes)

Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.450

Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 3.283

Mejor tratamiento de Citocinina: BA 10.0 [µM]



Gráfica N° 17. Número de Brotes. (ANA/BA).

Tipo de Transformación Empleada : Logarítmica

Efecto de la Auxina (ANA): Altamente Significativo (***)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000

Efecto de la Citocinina (BA): Altamente Significativo (***)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000

Efecto de la Interacción:

Auxina (ANA)/Citocinina(BA): Altamente Significativo (***)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000

i) Prueba de Tukey al Nivel de Confianza de 5.0 %

Mejor Tratamiento Para la Auxina: ANA 0.0, 1.0 y 10.0 [μM]

Mejor Tratamiento Para la Citocinina: BA Sin diferencias al 5%.

ii) Prueba de Duncan al Nivel de confianza de 5.0 %

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (ANA Vs. Número de Brotes)

Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.427

Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 4.808

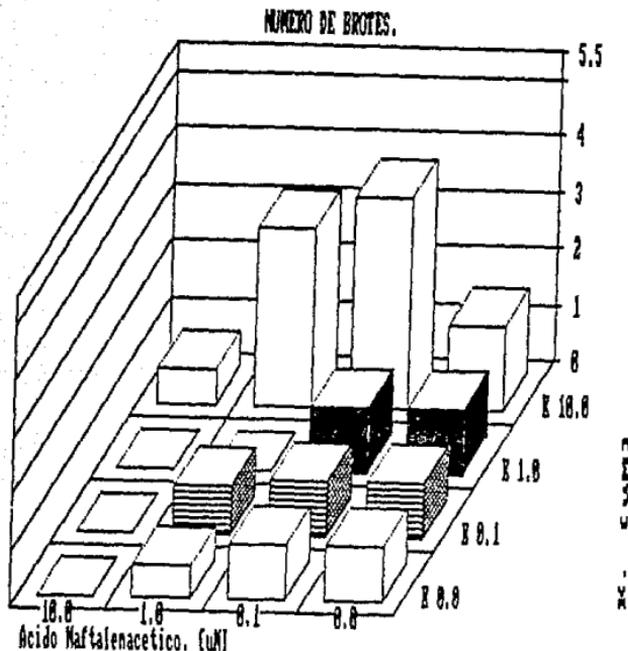
Mejor tratamiento Para de Auxina ANA : 0.0 y 10.0 [μM]

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (BA Vs. Número de Brotes)

Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.384

Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 3.131

Mejor tratamiento de Citocinina BA : 10.0 [μM]



Gráfica N° 18. Número de Brotes. (ANA/K).

Tipo de Transformación Emplenda : Raíz Cuadrada.

Efecto de la Auxina (ANA) Altamente Significativo (***)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000

Efecto de la Citocinina (K.) Altamente Significativo (***)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000

Efecto de la Interacción:

Auxina (ANA)/Citocinina(K.) Altamente Significativo (***)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000

i) Prueba de Tukey al Nivel de Confianza de 5.0 %

Mejor Tratamiento Para la Auxina ANA : 0.0, 0.1 y 1.0 [µM]

Mejor Tratamiento Para la Citocinina K.: 10.0 [µM]

ii) Prueba de Duncan al Nivel de confianza de 5.0 %

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (ANA Vs. Número de Brotes)

Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.645

Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 11.27

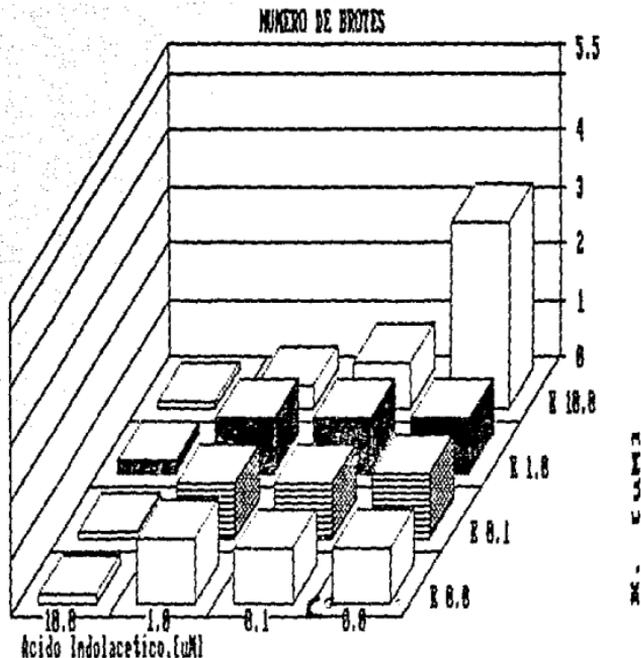
Mejor tratamiento Para de Auxina ANA 0.0, 0.1 y 1.0 [µM]

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (K. Vs. Número de Brotes)

Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.424

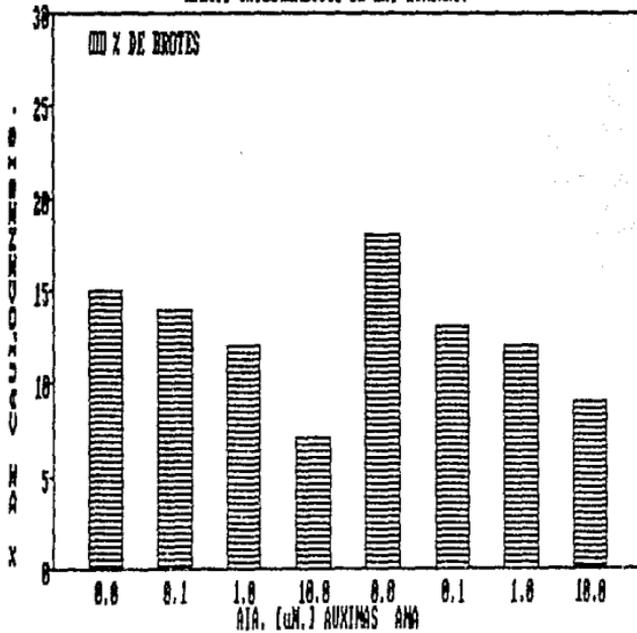
Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 2.469

Mejor tratamiento de Citocinina K. 10.0 [µM]



Gráfica Nº 19. Número de Brotes. (AIA/K)
 Tipo de Transformación Empleada : Raíz Cuadrada.
 Efecto de la Auxina (AIA): Altamente Significativo (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 Efecto de la Citocinina (K.): No Significativo (N.S.)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.988
 Efecto de la Interacción:
 Auxina (AIA)/Citocinina(K.): Altamente Significativo.
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 i) Prueba de Tukey al Nivel de Confianza de 5.0 %
 Mejor Tratamiento Para la Auxina AIA: 0.0 [µM]
 Mejor Tratamiento Para la Citocinina K. Sin Diferencias al 5%
 ii) Prueba de Duncan al Nivel de confianza de 5.0 %
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (AIA Vs. Número de Brotes)
 Prueba de Cochrans. Varianza MÁXIMA/Suma de Varianzas= 0.289
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 1.99
 Mejor tratamiento Para de Auxina AIA : 0.0 [µM]
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (K. Vs. Número de brotes)
 Prueba de Cochrans. Varianza MÁXIMA/Suma de Varianzas= 0.548
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 4.113
 Mejor tratamiento de Citocinina K. : Sin Diferencias al 5%.

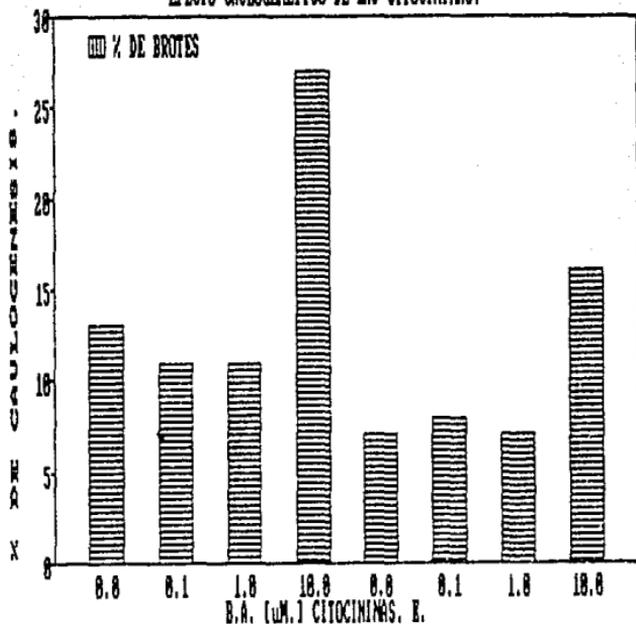
EFFECTO CAULOGENETICO DE LAS AUXINAS.



Gráfica Nº 20. Efecto caulogenético de las Auxinas AIA,ANA.
Número de brotes

AUXINAS	% PARCIAL DE CAULOGENESIS	[μM]	% DE BROTES POR TRATAMIENTO
AIA	48 %	0.0	15 %
		0.1	14 %
		1.0	12 %
		10.0	7 %
ANA	52 %	0.0	18 %
		0.1	13 %
		1.0	12 %
		10.0	9 %

EFFECTO CAULOGENETICO DE LAS CITOCININAS.



Gráfica 21. Efecto Caulogénico de las Citocininas BA, K.
Número de Brotes.

CITOCININA	% PARCIAL DE CAULOGENESIS	[μM]	% DE BROTES POR TRATAMIENTO.
BA	62 %	0.0	13 %
		0.1	11 %
		1.0	11 %
		10.0	27 %
K.	38 %	0.0	7 %
		0.1	8 %
		1.0	7 %
		10.0	16 %

Rizogénesis.

La rizogénesis *in vitro* de *D. stramonium* observada en los cuatro barridos hormonales realizados fué determinada principalmente por el efecto de la auxina ANA, la cual mostró un potencial rizogénico más alto, particularmente en su concentración 1.0 [μ M] donde se presentó el 20 % del total de la rizogénesis cuantificada, mientras que el ácido indolacético no produjo diferencias significativas debidas al tratamiento.

Es significativo el hecho de que los mejores tratamientos observados se presentaron en la concentración 1.0 [μ M] de ambas auxinas (Gráficas 23 y 24) esta semejanza en el efecto rizogénico de ambas hormonas podría llevarnos a pensar que la capacidad rizogénica de ambas auxinas es igual sin embargo en el caso del ácido indolacético las diferencias no resultaron significativas (Gráfica 23) mientras que en el caso del ácido Naftalenacético las diferencias si fueron altamente significativas por lo que podemos concluir categóricamente que para *D. stramonium* la mejor auxina para inducir la rizogénesis es ANA, a la concentración 1.0 [μ M] en ausencia de cualquier citocinina ya que el mejor porcentaje de ocurrencia de rizogénesis (20 %) se presentó en esta auxina y a la concentración antes citada (Gráfica 27).

El efecto de la auxina ANA en la rizogénesis produjo diferencias altamente significativas debidas al tratamiento (***) $P(F) = 0.000$ en los dos barridos hormonales en los que se utilizó ANA. La prueba de separación de medias de Duncan muestra que los mejores tratamientos fueron 1.0 [μ M] para la combinación hormonal

ANA/BA (Gráfica 24) y para la combinación ANA/K los mejores tratamientos de acuerdo a la prueba de Duncan resultaron ser 1.0 y 10.0 μM las cuales son estadísticamente iguales entre sí al nivel de 5 % (Gráfica 25). De la misma manera la prueba de Tukey mostró que los mejores tratamientos de ANA son los mismos que indicó la prueba de Duncan. (Gráficas 24 y 25). El efecto auxínico del ácido indolacético (AIA) en las dos combinaciones realizadas resultó sin diferencias significativas con $P(F) = 0.117$ para la combinación hormonal AIA/K (Gráfica 23) y una $P(F) = 0.012$ para la combinación AIA/K (Gráfica 25).

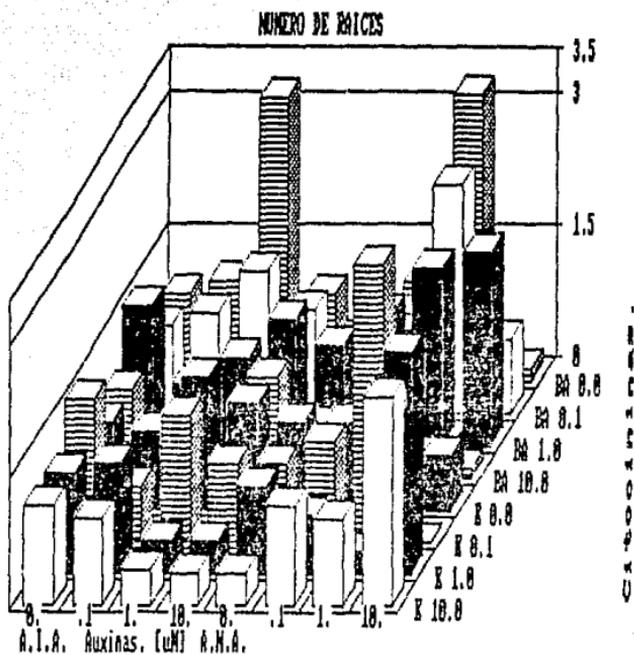
En la Gráfica 27 se puede notar el significativo efecto rizogénico de la auxina ANA en su concentración 1.0 μM en la que ocurrió el 20% del total de la rizogénesis observada.

De manera general el efecto de las citocininas empleadas (BA,K) tuvieron un efecto inhibitorio de la rizogénesis, sin embargo el único tratamiento significativamente inhibitorio de la rizogénesis fue la citocinina BA en su tratamiento 10.0 μM el cual solo permitió el 5 % de la rizogénesis total (Gráfica 28).

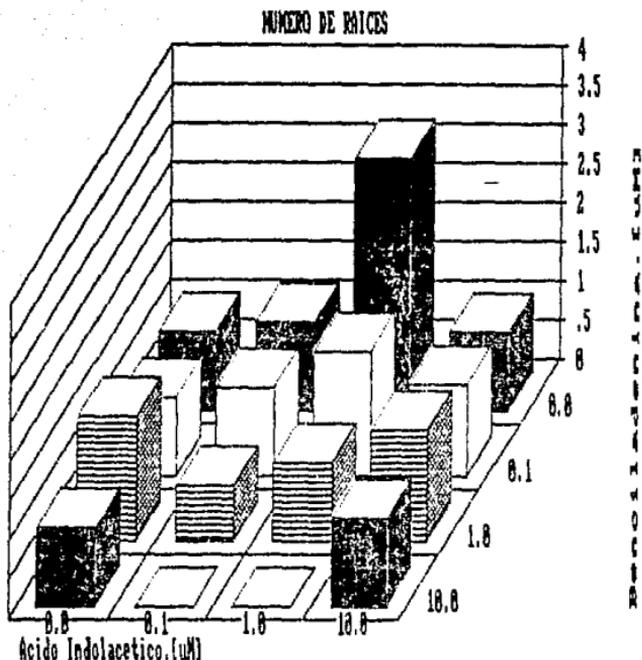
El efecto en la rizogénesis de las citocininas BA,K fue muy diverso: En la combinación AIA/BA resultó solamente significativo (*) con una $P(F) = 0.005$. En la combinación ANA/BA las diferencias entre los tratamientos no fueron significativas (N.S) con $P(F) = 0.021$ (Gráfica 24). En la combinación hormonal ANA/K la cinetina produjo diferencias entre los tratamientos altamente significativos (***), $P(F) = 0.000$ (Gráfica 25). En la combinación hormonal AIA/K la rizogénesis no mostró diferencias significativas (N.S.) debidas al tratamiento con cinetina con una $P(F) = 0.211$ (Gráfica 26).

La interacción Auxina/Citocinina no mostró efectos estadísticamente diferentes en tres de los cuatro barridos hormonales realizados: (Gráficas 23,24,26) y altamente significativos (***) en la combinación ANA/K con una $P(F) = 0.000$ que fue el único caso de rizogénesis en la que hubo efecto sinérgico debido a la interacción ANA/K y el mejor tratamiento obtenido en este barrido hormonal resultó el tratamiento 1.0 [μM] de ANA con 0.1 [μM] de K. (Gráfica 25).

En términos generales la interacción Auxina /Citocinina no produjo un efecto sinérgico de la rizogénesis en tres de los cuatro barridos hormonales en los que se evaluó la rizogénesis, (AIA/BA, ANA/BA, AIA/K) de estos los mejores tratamientos se presentaron cuando la auxina pudo actuar un ausencia de cualquier citocinina, (Gráficas 23, 24 y 26), excepto en la combinación hormonal ANA/K en la que se presentó efecto sinérgico al actuar en conjunto la auxina ANA en su concentración 1.0 [μM] con la citocinina K 0.1 [μM] (Gráfica 25).



Gráfica Nº 22 Efecto rizogenético de las hormonas AIA,ANA/BA,K.



Gráfica N° 23. Rizogénesis. (AIA/BA).

Tipo de Transformación Empleada : Raíz cuadrada.

Efecto de la Auxina (AIA) : No significativo (N.S.)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.117

Efecto de la Citocinina (BA) : Significativo (*)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.005

Efecto de la Interacción:

Auxina (AIA)/Citocinina(BA): No Significativo (N.S.)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.049

i) Prueba de Tukey al Nivel de Confianza de 5.0 %

Mejor Tratamiento Para la Auxina AIA : sin diferencias al 5 %

Mejor Tratamiento Para la Citocinina BA : 0.0,0.1, y 1.0 [µM]

ii) Prueba de Duncan al Nivel de confianza de 5.0 %

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (Aux AIA Vs. Rizogénesis)

Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.362

Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 3.96

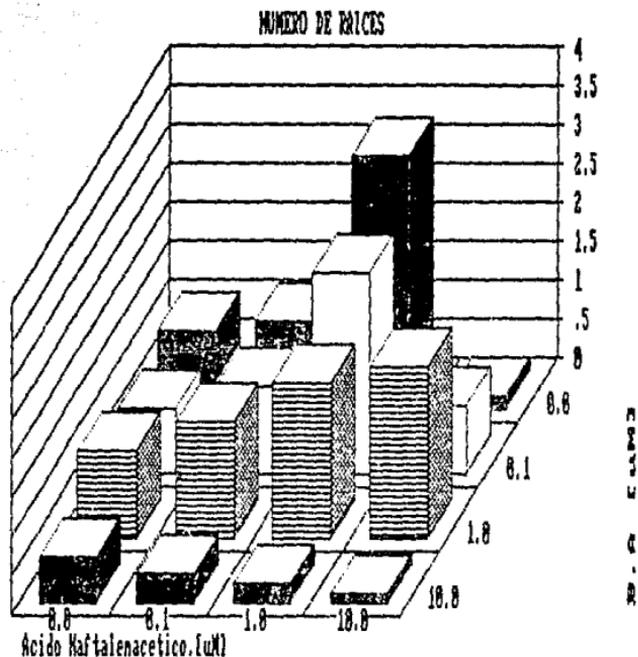
Mejor tratamiento Para de Auxina AIA : sin diferencias al 5 %

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (BA Vs. Rizogénesis.)

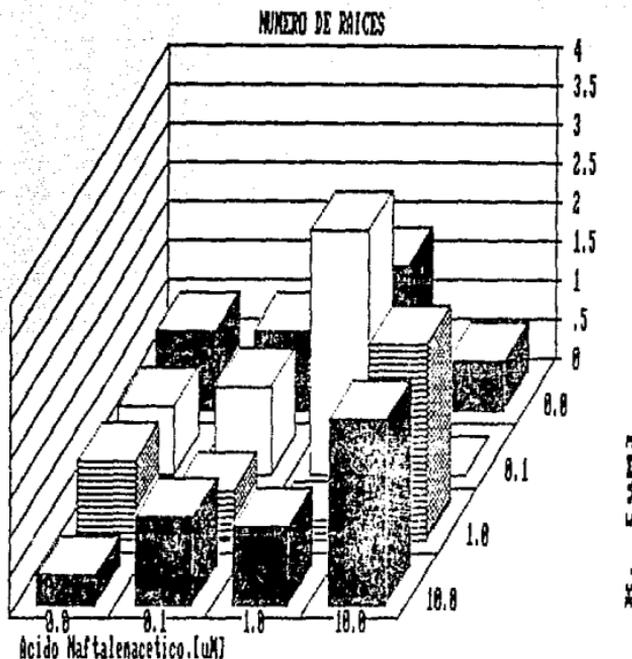
Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.337

Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 2.908

Mejor tratamiento de Citocinina BA : 0.0, 0.1 y 10.0 [µM]



Gráfica Nº 24. Rizogénesis. (ANA/BA).
 Tipo de Transformación Empleada : Ninguna.
 Efecto de la Auxina (ANA) : Altamente Significativo. (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 Efecto de la Citocinina (BA) : Altamente Significativo (***)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000
 Efecto de la Interacción:
 Auxina (ANA)/Citocinina(BA): No significativo (N.S.)
 Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.021
 1) Prueba de Tukey al Nivel de Confianza de 5.0 %
 Mejor Tratamiento Para la Auxina ANA: 1.0 [μM]
 Mejor Tratamiento Para la Citocinina BA : Sin Diferencias al 5 %
 ii) Prueba de Duncan al Nivel de confianza de 5.0 %
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (ANA Vs. Rizogénesis)
 Prueba de Cochran. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.627
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 7.85
 Mejor tratamiento Para de Auxina ANA : 1.0 [μM]
 Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (BA Vs. Rizogénesis.)
 Prueba de Cochran. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.481
 Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 9.04
 Mejor tratamiento de Citocinina BA : 0.0, 0.1 y 1.0 [μM]



Gráfica Nº 25 Rizogénesis. (ANA/K).

Tipo de Transformación Empleada : Logarítmica.

Efecto de la Auxina (ANA) : Altamente Significativa (***)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000

Efecto de la Citocinina (K) : No Significativo.(N.S.)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.490

Efecto de la Interacción:

Auxina (ANA)/Citocinina(K): Altamente Significativo. (***)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.000

i) Prueba de Tukey al Nivel de Confianza de 5.0 %

Mejor Tratamiento Para la Auxina ANA : 1.0 y 10.0 [μM]

Mejor Tratamiento Para la Citocinina K Sin Diferencias al 5 %

ii) Prueba de Duncan al Nivel de confianza de 5.0 %

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (ANA Vs. Rizogénesis)

Prueba de Cochran. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.442

Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 5.46

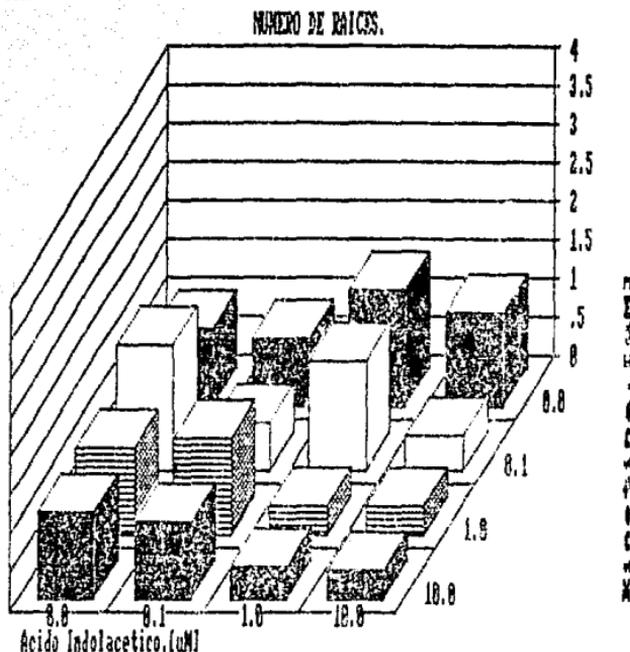
Mejor tratamiento Para de Auxina ANA : 1.0 y 10.0 [μM]

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (K Vs. Rizogénesis)

Prueba de Cochran. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.301

Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 2.214

Mejor tratamiento de Citocinina K : Sin Diferencias al 5 %



Gráfica Nº 26. Rizogénesis (AIA/K)

Tipo de Transformación Empleada : Raíz Cuadrada.

Efecto de la Auxina (AIA) : No Significativo (N.S.)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.012

Efecto de la Citocinina (k) : Significativo (*)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.002

Efecto de la Interacción:

Auxina (AIA)/Citocinina(K): No Significativo (N.S.)

Nivel de Confianza (Probabilidad de F)= 0.211

i) Prueba de Tukey al Nivel de Confianza de 5.0 %

Mejor Tratamiento Para la Auxina AIA : Sin Diferencias al 5 %

Mejor Tratamiento Para la Citocinina K : 0.0, 0.1, 1.0

ii) Prueba de Duncan al Nivel de confianza de 5.0 %

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (AIA Vs. Rizogénesis)

Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.302

Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 2.299

Mejor tratamiento Para de Auxina AIA : Sin Diferencias al 5 %

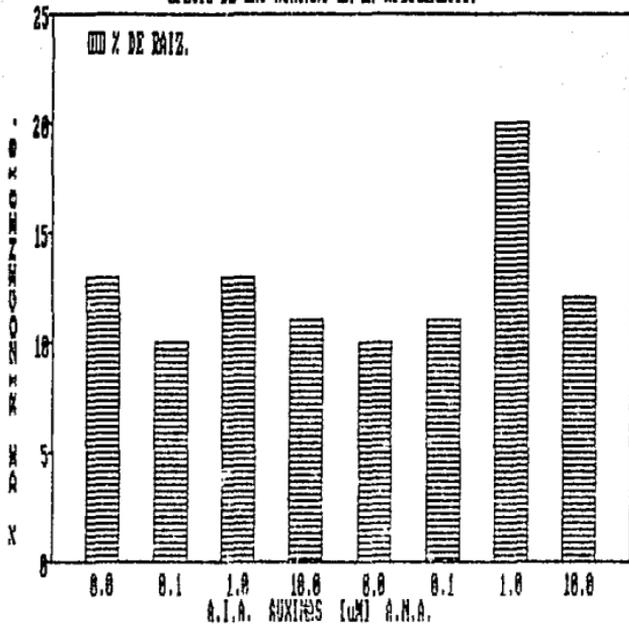
Pruebas de Homogeneidad de Varianzas (K Vs. Rizogénesis)

Prueba de Cochrans. Varianza Máxima/Suma de Varianzas= 0.39

Relación Varianza Máxima / Varianza Mínima= 4.454

Mejor tratamiento de Citocinina K : 0.0, 0.1, 1.0

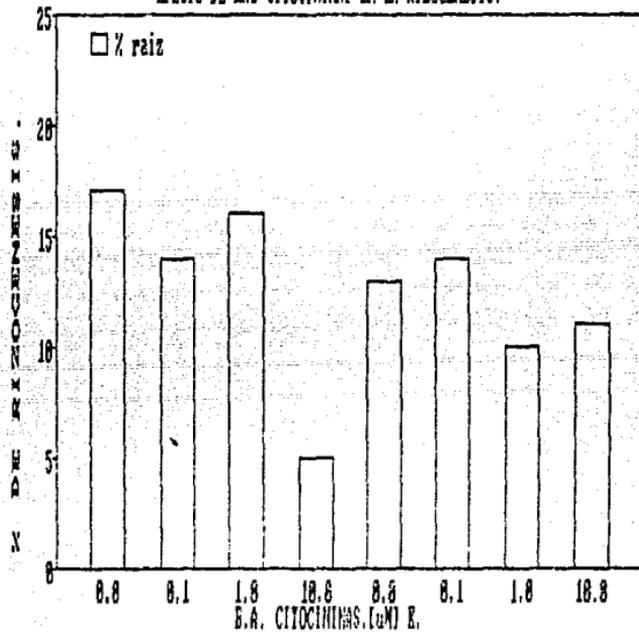
EFFECTO DE LAS AUXINAS EN LA RIZOGENESIS.



Gráfica Nº 27. Efecto Rizogénico de las Auxinas AIA,ANA.
Numero de Raíces.

AUXINA.	% PARCIAL DE RIZOCENESIS.	[µM]	% DE RIZOGENESIS POR TRATAMIENTO.
AIA	47 %	0.0	13 %
		0.1	10 %
		1.0	13 %
		10.0	11 %
ANA	53 %	0.0	10 %
		0.1	11 %
		1.0	20 %
		10.0	12 %

EFFECTO DE LAS CITOCININAS EN LA RIZOGENESIS.



Gráfica Nº 28. Efecto Rizogénico de las Citocininas. BA,K
Número de Raíces.

CITOCININA.	% PARCIAL DE RIZOGENESIS.	[uM]	% DE RIZOGENESIS POR TRATAMIENTO.
BA	52 %	0.0	17 %
		0.1	14 %
		1.0	16 %
		10.0	5 %
K	48 %	0.0	13 %
		0.1	14 %
		1.0	10 %
		10.0	11 %

Discusión.

Diversos investigadores que han estudiado la morfogénesis y regeneración in vitro de 42 especies solanáceas diferentes han encontrado que 38 de éstas han respondido notablemente de manera similar ante la variación de las proporciones relativas de auxina/citocinina, encontrándose como regla general que la proporción auxina:citocinina > 1 favorece la formación de callo; pero si ésta es < 1 se obtiene la formación de brotes adventicios (Flick et al. 1983).

De manera general los resultados obtenidos en la presente investigación difieren sustancialmente de estos hallazgos, ya que, los únicos resultados observados de acuerdo a las predicciones de la teoría del balance hormonal se presentaron únicamente en el barrido hormonal ANA/K en el cual la generación significativa ($P(F) < 0.0001$) de brotes adventicios se obtuvo mediante la proporción de auxina:citocinina de 0.1:10.0 [μM] (< 1) (Gráfica N° 18). En todos los demás casos los mejores tratamientos para la inducción de raíces o brotes se presentaron cuando la auxina o citocinina en cuestión, pudo actuar de manera individual, ya que, la interacción auxina:citocinina fue de manera general antagónica.

Los datos aquí obtenidos resultan similares a los reportados por Engvild, 1983 (citado por Flick et al., 1982) quien encontró formación significativa de brotes adventicios a la concentración de 1.0 [μM] de BA a partir de secciones nodales de tallo de D. inoxia. De la misma manera Hirakoga y Tabata (1974; citados por Flick et al., 1983) determinaron como su mejor tratamiento caulogénico 100 [μM] de BA, sin la combinación de una auxina en

ambos casos, lo que demuestra que el género Datura no responde de manera típica a la inducción de la morfogénesis como ocurre en la mayoría de las especies solanáceas en que se ha estudiado la morfogénesis in vitro mediante la variación de las proporciones relativas de auxina:citocinina. En otras investigaciones que se han realizado sobre la morfogénesis en el género Datura varios investigadores han encontrado que en lo que a caulogénesis se refiere, los tratamientos óptimos han sido en la mayoría de los casos cuando se emplea alguna citocinina sin la combinación de una auxina (Engvliid, 1973; Hirakoa y Tabata, 1974 citados por Flick et al. 1982). La única excepción resulta ser el trabajo de Sapory y Maheswari (1976, citado por Flick et al., 1982) donde el mejor tratamiento morfogénético (caulogénesis) se obtuvo con la combinación de una auxina con una citocinina (9.3 μM de K y 9.3 μM de adenina, es decir con una proporción auxina:citocinina 1:1 utilizando tallo y hoja de plantas haploides de D. innoxia.

Respecto a la callogénesis (peso seco y peso fresco), también resultó contrario a lo esperado, ya que, en todos los casos los tratamientos significativamente formadores de callo resultaron en la proporción auxina:citocinina 1:1 (gráficas 1 - 14) y no en los tratamientos con proporción auxina:citocinina > 1 tal y como ha ocurrido en 38 de 42 especies solanáceas estudiadas (Flick et al., 1982). Resulta indudable que el regulador del crecimiento con un mejor efecto en la callogénesis es la auxina 2,4-D a la concentración 1.0 μM (Flick et al., 1982).

Las notables propiedades biodinámicas de D. stramonium la hacen objeto de aprovechamiento en sistemas agronómicos de

explotación, a fin de obtener los satisfactores farmacológicos que se derivan de esta especie, sin embargo, las particularidades biológicas de esta especie constituyen una dificultad para hacerlo de la manera más productiva posible.

Por un lado D. stramonium es una especie anual, lo cual implica que habría que establecer el cultivo al inicio de cada ciclo reproductivo a partir de semillas producidas estas a través de un ciclo reproductivo sexual.

En el ciclo reproductivo sexual nuevas plantas surgen después de la fusión de los gametos parentales y que posteriormente se desarrollan en semillas.

En este caso las plántulas serán genéticamente variables y cada una de ellas representa una nueva combinación y arreglo de genes producido por la meiosis.

La heterogeneidad genotípica en poblaciones de plantas destinadas a su aprovechamiento comercial resulta desde el punto de vista productivo una importante desventaja.

El otro inconveniente que representan las particularidades biológicas de Datura stramonium para su explotación agronómica, surgen de su naturaleza autógena.

Las especies que presentan reproducción autógena (automixis) tienen la particularidad de manifestar una muy alta plasticidad fenotípica, que es la habilidad de un organismo individual de alterar su morfología y/o fisiología en respuesta a cambios en las condiciones ambientales. Existe una relación inversamente proporcional entre la plasticidad fenotípica y la heterocigocidad génica, de modo que especies con heterocigocidad baja tienen una plasticidad fenotípica alta, (Schlichting, 1986), además de que

es propio que las especies autógamas presenten un alto índice de recombinación genética (Radford, 1974), esto es un mayor número de secuencias de genes intercambiados entre cromátidas hermanas durante la metafase de la división meiótica. En este caso las plántulas serán genéticamente variables y cada una de ellas representa una nueva combinación y arreglo de genes producido por la meiosis. Lo que se traduce en una mayor heterogeneidad genotípica de la población.

Por todas estas características, Datura stramonium al ser utilizada en un sistema de explotación agronómico heterogéneo, se manifestaría su alta plasticidad fenotípica variando en sus características fisiológicas y morfológicas, afectando en consecuencia su productividad y rendimientos. (producción de alcaloides).

La reproducción autógama en D. stramonium es fácilmente reconocible debido a la presencia de varios rasgos de su biología reproductiva, tales como: a) anteras adyacentes al estigma, b) anteras introrsas, c) corola funeliforme (Radford, 1974).

Además del hecho de presentar en las anteras una línea de dehiscencia longitudinal hacia el estigma revela que en el curso de su evolución esta especie ha llegado a ser una especie auto-compatible (Solbrig, 1970).

Esta característica aunada al hecho de que la dehiscencia ocurre cuando el estigma se encuentra a la misma altura que las anteras, lo cual asegura la autopolinización y disminuye la posibilidades de una polinización cruzada, tal y como ha ocurrido en las variedades cultivadas de Lycopersicon esculentum

(Solanaceae) que sus estructuras florales se han modificado en su proceso de domesticación desde formas ancestrales auto-incompatibles debido a la posición de las anteras más alejadas del estigma, hacia variedades auto-compatibles donde el estigma se encuentra a la misma altura de las anteras (Rick, 1976).

La micropropagación clonal masiva permite superar los inconvenientes que se derivan de la reproducción endogámica (con automixis) como lo es la alta plasticidad fenotípica debido a la baja heterocigocidad génica, así como la variabilidad genética propia de los ciclos reproductivos sexuales.

La reproducción vegetativa, permite que las características genéticas individuales de una planta son perpetuadas por el crecimiento y multiplicación de las células en las cuales los genes son copiados exactamente por división mitótica, por lo que cada planta producida por este método puede ser considerada como una extensión de una línea celular somática de un solo individuo, un grupo de tales plantas producidas asexualmente es llamada clon. (George y Sherrington, 1984), hecho de gran importancia cuando se busca homogeneidad en las propiedades de las plantas sujetas a sistemas de explotación comercial.

Sin embargo, para conseguir la homogeneidad de los genotipos de los organismos clonados se debe poner atención al método de propagación empleando, ya que las plantas que derivan de meristemas, ápices y yemas, son generalmente genotípicamente homogéneas, lo que indica estabilidad genética. La vasta mayoría de todas las plántulas regeneradas a partir de meristemas se han encontrado que permanecen en su condición diploide (Ancora *et al.*, 1981; Hasegawa *et al.*, 1973; citados por Hu, 1983;

Murashige, 1974.). Las plantas regeneradas a partir de cultivo de ápices han mostrado su estabilidad genética (D'amato, 1975; Morel, 1975; Murashige, 1974 citados por Reisch, 1983), aunque ocasionalmente han mostrado variaciones (Bush et al. 1976; Denton et al. 1977 citados por Reish, 1983), la estabilidad genética de las plantas regeneradas a partir de ápices se debe a que en esta estructura la división celular y la replicación de DNA está estrictamente controlada y que las células que se encuentran afectadas en su capacidad reproductora (con defectos genéticos) son eliminadas por competencia (D'amato, 1977, citado por Reisch, 1983).

Cuando la micropropagación involucra un estado intermedio de callo, la frecuencia de cambios genéticos se ha visto incrementada especialmente en poliploidias y aneuploidias (Bayliss, 1973; Mahlberg et al. 1975 citados por Hu, 1983). Estos métodos de regeneración que involucran un paso a través de tejido indiferenciado (callo) han llegado a ser una nueva y útil fuente de variación genética. Esta variación producida por el uso de estos métodos de regeneración vegetal se le ha denominado variación somaclonal (Reisch, 1983).

De lo anterior se concluye que en vista de las particularidades biológicas de D. stramonium y las virtudes de la micropropagación clonal resulta conveniente la utilización de estos métodos de propagación a fin de superar estos inconvenientes y permitir el aprovechamiento óptimo de este valioso recurso genético Mexicano.

7.0 CONCLUSIONES.

1.-) Se aplicaron los métodos y técnicas de C.T.V. a D. stramonium obteniéndose resultados que permitirán el mejor aprovechamiento futuro de este importante recurso genético mexicano.

2.-) Se determinó el efecto morfogenético en embriones zigóticos de D. stramonium, de dos auxinas (AIA, ANA) y dos citocininas (BA, K) a diferentes concentraciones, proporciones relativas y combinaciones de ellas. La caracterización del efecto morfogenético se determinó evaluando la generación de callo (peso fresco y peso seco), y contando la formación de novos de raíces, y brotes.

El peso seco y fresco de callo que se observó, fue generado principalmente bajo la influencia de las auxinas cuyo efecto fue altamente significativo (***) especialmente cuando la auxina utilizada fue ANA. En cuanto a la interacción auxina /citocinina, fue altamente significativa en casi todos los casos y existieron numerosos casos de sinergismo en la callogénesis.

La rizogénesis fue principalmente promovida por las auxinas, especialmente ANA, que fue la hormona cuya rizogénesis fue significativamente más alta, mientras que la auxina AIA no mostró diferencias significativas. El efecto de las citocininas fue inhibitorio de la rizogénesis, la de mayor efecto inhibitorio en la rizogénesis fue la BA. La interacción auxina/citocinina fue altamente significativo pero antagonica de la rizogénesis.

La generación de brotes adventicios (caulogénesis) fue significativamente mayor bajo el efecto de la citocinina BA que la cinetina K, por el contrario, el efecto de las auxinas en la

caulogénesis fue de inhibición, ya que al incrementar la concentración micromolar el número de brotes tiende a disminuir, se observó efecto antagónico entre auxinas y citocininas cuando se utilizaron en combinación a diferentes proporciones y combinaciones.

3.-) La caracterización del efecto morfogenético de diversos reguladores de crecimiento tiene una de sus más importantes aplicaciones en la regeneración vegetal, la cual para poder llevarse a cabo es indispensable determinar qué reguladores de crecimiento y en qué concentraciones, proporciones y combinaciones pueden producir el mejor efecto morfogenético deseado, a partir del análisis estadístico practicado a los datos obtenidos, podemos concluir que:

Para Datura stramonium la rizogénesis es más eficientemente producida por la auxina ANA, a la concentración 1.0 (μM) en ausencia de citocininas ya que su combinación con las auxinas tiene efecto antagónico.

La caulogénesis resulta significativamente estimulada por la citocinina BA, especialmente a la concentración 10.0 (μM) sin la combinación de auxina alguna.

Las auxinas son los fitoreguladores que determinan la callogénesis, de las auxinas empleadas AIA, ANA de estos el ácido naftalenacético (ANA) resultó el promotor más significativo de la callogénesis, en todos los casos en que se evaluó el callo (pcao fresco y peso seco) La interacción auxina/citocinina mostró diferencias significativas debidas al tratamiento y existieron varios casos de efectos sinérgicos en la callogénesis de

los fitoreguladores empleados. la combinación hormonal más callogénica fue ANA/BA en sus concentraciones 10.0 y 1.0 [µM] respectivamente, sin embargo el tratamiento más callogénico significativamente diferente ocurrió en la combinación AIA/BA (1.0 [µM] de BA. y 10.0 [µM] De AIA).

4.-) De las conclusiones anteriores se puede derivar la primera aplicación práctica cuya aportación sería en la regeneración vegetal en una metodología de micropropagación para D. stramonium, a continuación se propone un modelo de micropropagación de acuerdo a Murashige (1974).

ETAPA I.

i.-) Esterilización y disección de embriones maduros de D. stramonium.

ETAPA II.

ii.-) Cultivo in vitro de los embriones aislados en medio M.S. adicionado con 10.0 [µM] de BA. con el propósito de inducir brotaciones múltiples.

iii.-) Subcultivo de los brotes obtenidos en el mismo medio de cultivo utilizado en el inciso ii.-) para incrementar geoméricamente el número de individuos (opcional).

ETAPA III.

iv.-) Aislamiento y subcultivo de los brotes en medio M.S. suplementado con 1.0 [µM] de ANA para promover la rizogénesis de los brotes y obtener plantas completas.

ETAPA IV.

v.-) Transplante de las plantas obtenidas in vitro a condiciones de invernadero y posterior aclimatación de los individuos.

Apendice N° 1 Medio de Cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962).

MACRONUTRIMENTOS.		
NUTRIMENTO.	mg/l	10X (g/10 l)
NH ⁴ NO ³ -----	1650.000	16.500
KNO ₃ -----	1900.000	19.000
MgSO ₄ · 7H ₂ O -----	370.000	3.7000
KH ₂ PO ₄ -----	170.000	1.7000

SOLUCION DE CLORURO DE CALCIO.		
NUTRIMENTO.	mg/l	10X (g/10 l)
CaCl ₂ · 2 H ₂ O -----	440.000	4.4000

MICRONUTRIMENTOS.		
NUTRIMENTO.	mg/l	10X (Mg/10 l)
KI -----	0.830	8.300
H ₃ BO ₃ -----	6.200	62.000
MnSO ₄ · H ₂ O -----	16.890	168.960
ZnSO ₄ · 7H ₂ O -----	8.600	86.000
Na MoO ₄ · 2H ₂ O -----	0.250	2.500
CuSO ₄ · 5H ₂ O -----	0.025	0.250
CoCl ₂ · 6H ₂ O -----	0.025	0.250

SOLUCION FERROSA QUELATADA.		
NUTRIMENTO.	mg/l	10X (Mg/10 l)
NaEDTA -----	37.700	373.000
FeSO ₄ · 7H ₂ O -----	27.800	278.000

COMPUESTOS ORGANICOS.		
NUTRIMENTO.	mg/l	10X (mg/10 l)
Inositol. -----	100.000	1000.0
Acido Nicotínico. -----	0.500	5.0
Piridoxina HCl. -----	0.500	5.0
Tiamina. -----	0.100	1.0
Glicina. -----	2.000	20.0
Sacarosa 30 g/l Agar 8 g/l pH 5.7 - 5.8.		

Apendice N° 2 Tinción de Gram. (Modificado por Hücker, 1957)

1.-Reactivo de Cristal Violeta-Oxalato de Amonio.

Solución A.

Cristal Violeta..... 0.2 gr
Alcohol etílico al 96 %.....200.0 ml

Solución B.

Oxalato de Amonio.....0.8 gr
Agua Destilada.....80.0 ml

Combinar la Solución A con la Solución B, Filtrar y reposar 24 horas antes de utilizarse.

2.- Solución de Lugol.

Solución A

Iodo.....1.0 gr
Ioduro de Potasio.....2.0 gr
Agua Destilada.....240.0 ml

Solución B

NaHCO₃ al 95 %60.0 ml

Combinar la Solución A con la Solución B, Filtrar y reposar 24 horas antes de utilizarse.

3.- Alcohol etílico al 96 %.

4.- Safranina para Tinción de Gram. (Sigma).

Técnica de Tinción.

- 1.- Preparar un frotis de la cepa y dejarla secar
- 2.- Cubrir la preparación con la solución de cristal violeta-oxalato de amonio, por un minuto.
- 3.- Lavar.
- 4.- Exponer la preparación a la solución de Lugol por un minuto y lavar.
- 5.- Decolorar con alcohol etílico al 96 % durante 45 segundos, lavar con agua.
- 6.- Aplicar el colorante de contraste (Safranina) por 30 segundos, lavar con agua.

8.0 BIBLIOGRAFIA.

- Aguilar, C. A., 1982. Plantas Tóxicas de México, INSS, México D.F.
- Aitken, Ch. J. y T. A. Thorpe, 1984. Clonal Propagation: Gymnosperms. In: I. Vasil, (Ed.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, 1984 :82-93. Academic Press Inc. Orlando Florida.
- Arditti, J., 1987. Clonal Propagation of Orchids by Means of Tissue Culture a Manual. En: J. Arditti, (Ed.), "Orchid Biology, Reviews and Perspectives, I", :203-293. Cornell Univ. Press, Ithaca, New York.
- Armstrong, P.W., 1988. The Deadly Datura. Pacific Discovery 39(4):34-41.
- Barba, A., 1987. Cultivo de Callos. En: Hurtado, D., Merino M. (Eds.) Cultivo de Tejidos Vegetales. 93-110. Editorial Trillas, México.
- Blanquez, A., 1981. Diccionario Manual Latino-Español y Español Latino. Editorial Ramón Sopena. Barcelona.
- Blakeslee, A. y S. Satina, 1944. New Hybrids From Incompatible Crosses in Datura Through Culture of Excised Embryos on Malt Media. Science 99: 331-339.
- Bidwell, R. G. S., 1979. Fisiología Vegetal. A.G.T. Editor, S.A.
- Bye, R. y E. Linares, 1987. Usos Pasados y Presentes de Algunas Plantas Medicinales Encontradas en los Mercados Mexicanos. América Indígena. 47(2):200-230.
- Bye, R., 1989. Taxonomic Synopsis of the Genus Datura L. in México, with an Ethnobotanical Summary. Aliso (en prensa).
- Collins, G. B., 1984. Culture of Embryos. In: I. Vasil (Ed.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Academic Press Inc., Orlando, Florida.
- Cronquist, A., 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York.
- Cronquist, A., 1982. Introducción a la Botánica. CECSA, México.
- Chan, W. N. y E. J. Staba, 1965. Alkaloid Production by Datura Callus and Suspension Tissues Cultures. Lloydia 28:55
- De la Cruz, M., Badiano, J., 1964. Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis, Manuscrito Azteca de 1552, Según Traducción Latina de Juan Badiano. IMSS., México. D.F.

- Díaz, J. L., 1979. Ethnopharmacology and Taxonomy of Mexican Psychodysleptic Plants. *Journal of Psychodelic Drugs*. 11(1-2):71-86.
- Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 1985. Ediciones PLM, México D.F.
- Dodds, J.H. and L.W.G Roberts, 1982. *Experiments in Plant Tissue Culture*, Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Eichholts et al., 1979b. Effects of Gentamicin on Shoot Initiation and Growth in Tobacco Callus. *Plant Physio.* 63(5):
- Evans, D.A. and J.E. Bravo, 1983. Protoplast Isolation and Culture, 124-176. In: Evans, D.A., W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.). *Plant Tissue Cultures Methods and Applications in Agriculture*. Academic Press, New York.
- Fári, M. and M. Czak, 1981. Relationship Between Position and Morphogenetic Response of Pepper Hypocotyl Explants Cultured in vitro. *Scientia Horticulturac*, 15: 207-213.
- Flick, C.E., D.A. Evans and W.R. Sharp, 1983a. Organogenesis, 13-81. In: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.) *Handbook of Plant Tissue Culture*, Volume 1, Techniques for Propagation and Breeding, Mc Millan Publishing Co., New York.
- Flick, C.E., D.A. Evans and W.R. Sharp, 1983b. Isolation of Mutants from Cel Culture. 393-433. In: D.A. Evans, W.R. Sharp, P. V. Ammirato and y Yamada (Eds.) *Handbook of Plant Tissue Culture*, Volume 1, Techniques for Propagation and Breeding, Mc Millan Publishing Co., New York.
- Furst, P., 1980. *Alucinógenos y Cultura*. Fondo de Cultura Económica, México.
- Gamborg, O.L., R.A Miller, and Ojima, K., 1968. Nutrients Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Exp. Cell. Res.* 50:151-158.
- Gamborg, O., 1984. *Plant Cell Cultures: Nutrition And Media*, In: I. Vasil, (Ed.) *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Academic Press. Inc, Orlando, Florida.
- Gautheret, R.T., 1982. *Plant Tissue Culture: The History*. In: *Plant Tissue Culture*. Proc. 5th Int. Congr. Japanese Assoc. of Plant Tissue Culture, Tokyo.
- García, G.M., 1940. *Breve Estudio Sobre el Toloacha*. Tesis Profesional, Escuela de Farmacia, Universidad Michoacana.

- George, F. E., Y P. D. Sherrington, 1984. Plant Propagation by Tissue Culture, Exegetics Ltd. England.
- Hartman, H.T., 1988. Propagación de Plantas C.E.C.S.A. México D.F.
- Hu, C. and P. Wang, 1983. Meristem, Shoot Tip and Bud Cultures, In: D.A. Evans, W.R. Sharp, P. V. Ammirato and Y Yamada (Eds.) Handbook of Plant Tissue Culture, Volume 1, Techniques for Propagation and Breeding, Mc Millan Publishing Co., New York.
- Hu, C. and P. Wang, 1986. Embryo Culture: Technique and Applications, In: D.A. Evans, W.R. Sharp, P. V. Ammirato and Yamada (Eds.) Handbook of Plant Tissue Culture, Volume 4, Techniques for Propagation and Breeding, Mc Millan Publishing Co., New York.
- Hücker, G. J., and J. Conn, 1923. Methods of Gram Staining, Tech Bull. N. Y. Sta. Agric. Exp. Sta. NQ93.
- Kamada, H. and N. Okamura, 1986. Alkaloid Production by Hair Root Cultures in Atropa belladonna. Plant Cell Reports 5: 239-242.
- Kartha, K. K., 1984. Culture of Shoot Meristems: I. Vasil (Ed.) Pea. En: "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants", 106-129. Academic Press Inc. Orlando Florida.
- Knauss, J. F. and M. E. Knauss, 1979 Contamination in Plant Tissue Culture, Proc. Fla. State Hortic. Soc., 9(92): 341-343. Knudson, L., 1922. Nonsymbiotic Germination of Orchid Seeds. Botanical Gazette. LXXIII(I):1-25.
- Lara, J.A., 1973 Contribución al Estudio de Plantas Tóxicas para Herbívoros en el Estado de Chihuahua. Tesis Profesional Fac. de Medicina Veterinaria y Zootécnia U.N.A.M, México; 1973.
- La Rue, C.D., 1936. The Growth of Plant Embryos in Culture. Bull. Torrey Bot. Club.(63):365-392.
- Leete, E., 1959 The Alkaloids of Datura In: Avery A.G., Rietscma J.(Eds.) Blakeslee. The Genus Datura. Ronald Press Company, New York.
- Linsmaier, E. M., and F. Skoog, 1965. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Culture. Physiol. Plantarum 18:100-127.
- Little, T.M., 1985, Métodos Estadísticos Para la Investigación en la Agricultura., Editorial Trillas México.
- Luna, S., 1987. Cultivo de Raíz. En: D. Hurtado, M. Merino, (Eds.) Cultivo de Tejidos Vegetales. pp. 87-92. Editorial Trillas, México D.F.

- Madueño, M., 1973. Cultivo de Plantas Medicinales. Publicaciones de Extensión Agraria, Madrid, España.
- Martínez, M., 1959. Las Plantas Útiles de México. Editorial Botas, México.
- Matuda, E., 1952. El Género Datura en México, Bol. Soc. Mex. de Bot. 14:1-13.
- Mc Lean, 1946. Interespecific Crosses Involving Datura ceratocaula Obtained by Embryo Dissection. American Journal of Botany. 33(8):630-638.
- Mendoza, H. G., 1979 Plantas Tóxicas Para la Ganadería en México, Tesis Profesional, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica, U.N.A.M., México.
- Merino, M. M., 1987. Medio de Cultivo. En: D. Hurtado, Merino, M. (Eds.) Cultivo de Tejidos Vegetales. :67-85. Editorial Trillas, México.
- Monnier, M., 1978. Culture of Zygotic Embryos. En: Frontiers of Plant Tissue Culture. (Thorpe, T.) Univ. of Calgary Press, Calgary, Canada.
- Monnier, M., 1984. Survival of Young Immature Cassella Embryos Cultured in vitro. J. Plant Physiol. 115:105-113.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962, A Revised Medium For Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Culture. Physiol. Plant. 15 : 473-499.
- Murashige, T., 1974 Plant Propagation Through Tissue Culture. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25: 135-166.
- Navarro, S., Vera, R., 1987. Historia del Cultivo de Tejidos Vegetales. En: D. Hurtado y Merino M. (Eds.), Cultivo de Tejidos Vegetales 1987. :15-34. Editorial Trillas, México.
- Pollock, K., D.G. Barfield and R. Shields, 1983. The Toxicity of Antibiotics to Plant Cell Cultures. Plant Cell Report (2):36-39.
- Radford, A. E., 1974. Vascular Plant Systematics. Harper and Row, Publishers. New York.
- Raghavan, V., 1977. Applied Aspects of Embryo Culture. In: Bajaj y Reinert (Eds.), Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1977. pp. 375-396. Springer Verlag, New York.
- Reisch, B., 1983. Genetic Variability In Regenerated Plants, In: D.A. Evans, W.R. Sharp, P. V. Ammirato and Yamada (Eds.), Handbook of Plant Tissue Culture, Volume 4,

Techniques for Propagation and Breeding, Mc Millan Publishing Co., New York.

- Reyes, C. P., 1980. *Biostatística Aplicada*. Editorial Trillas, México.
- Rietsema, J. and S. Satina, 1959. Barriers to Crossability: Post-Fertilization. In: Avery A., Satina, S., Rietsema, J., Blakeslee A., (Eds.), *The Genus Datura*: 245-262. New York, Ronald Press.
- Rick, H. Ch., 1976. Tomato. En: Simmonds, N. W. (Eds) *Evolution of Crop Plants*. Longman Group London : 268-273.
- Robles, F.M., 1975. Actividad Auxínica de Algunas Penicilinas en Cultivo *in vitro* de Rouvardia ternifolia Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Rojas, G. M., 1979. *Fisiología Vegetal Aplicada* McGraw-Hill, México D.F.
- Safford, W.E., 1921. Synopsis of the Genus Datura. *Jour. of the Washington Acad. Sci.* 11(8): 173-189.
- Safford, W.E., 1922. *Daturas of the Old World and New. An Account of their Narcotic Properties and Their Use in Oracular and Initiatory Ceremonies*. Smithsonian Report for 1920, Pub. 2644, pp. 537-567.
- Sahagún, B., 1938. *Historia General de las Cosas de Nueva España*. Editorial Pedro Robredo, México.
- Sanders, M., 1950. Development of Self and Hybrid Datura Embryos in Artificial Culture. *Amer. Jour. of Bot.* 37:8-15.
- Sanders, M., 1948. Embryo Development in Four Datura Species Following Self and Hybrid Pollinations. *American Journal of Botany*. 35 :525-532.
- Satina, S., J. Rappaport and A.F. Blakeslee, 1950. Ovular Tumors Connected with Incompatible Crosses in Datura *Amer. Jour. of Bot.* 37:576-586.
- Satina, S. y A.G. Avery, 1959. A Review of the Taxonomic History of Datura En: Avery, A. G., S. Satina, J. Rietsema, Blakeslee. (Eds.), *The Genus Datura*. pp. 16-38. New York, N.Y. Ronald Press.
- Schaffner, C.D., 1979. Animal and Plant Tissue Decontamination. In: Maramorosch K., y H. Hirumi (Eds.) *Practical Tissue Culture Applications*. Academic Press, San Francisco. 203-214.
- Schieder, O., 1978. Somatic Hybrids of Datura innoxia Mill. + Datura discolor Bernh. and Datura innoxia Mill. +

- Datura stramonium L. Var tatula L. I Selection and Characterization. Mol. Gen. Genet. 162, 113-119.
- Schieder, O., 1984. Isolation and Culture of Protoplast: Datura
In: I. Vasil (Eds), Cell Genetics of Plants, pp.350-355.
Academic Press Inc., Orlando, Florida.
- Schlicchting, D.C., 1986. The Evolution of Phenotypic Plasticity
in Plants. Annual Review of Ecology and Systematics
(17):867-893.
- Schultes R., 1982a. Las Plantas de los Dioses. Fondo de Cultura
Económica, México.
- Schultes R., 1982b. Plantas Alucinógenas. La Prensa Médica
Mexicana, S.A., México.
- Skoog, F. y C. Miller, 1957. Chemical Regulation of Growth and
Organ Formation In: Plant Tissue Culture in vitro. Symp.
Soc. Exp. Biol. II: 118-130.
- Snedecor, W., 1981. Métodos Estadísticos. C.E.C.S.A. México.
- Solbrig, O. T., 1970. Principles and Methods of Plant
Biosystematics, The Mc Millan Company, London.
- Staba, J., 1980. Secondary Metabolism and Biotransformation. In:
Staba J. (Ed). Plant Tissue Culture as a Source of
Biochemicals. C.R.C. Florida.: 69-97.
- Street, H.E., 1977. Plant Tissue Culture. Sec Ed. Academic Press.
pp. 1-10 E.U.A.
- Thorpe, T. A., and R. F. Kamlesh., 1984. Clonal Propagation:
Adventitious Buds. In: I. Vasil (Ed.) Cell Culture And
Somatic Cell Genetics of Plants. :49-67. Academic Press
Inc., Orlando Florida.
- Yeung, E. and T. Thorpe, 1981. In vitro Fertilization and Embryo
Culture. In: Thorpe T. (Ed.) pp. 253-271. Plant Tissue
Culture Methods and Applications in Agriculture. Academic
Press. E.U.A.
- Van Overbeek, J., M.E. Conklin, and A.F. Blakeslee, 1941. Factors
in Coconut Milk Essential for Growth and Development of
Very Young Datura Embryos. Science, 94:350-351.
- Van Overbeek, J., M.E. Conklin, y A.F. Blakeslee, 1942.
Cultivation in vitro of Small Datura Embryos. Amer.
Jour. of Bot. 29:472-477.
- Van Overbeek, J., 1944. Factors Affecting the Growth of Datura
Embryos in vitro. Amer. Jour. of Bot. 31(4): 219-224.