

126

24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

**INFLUENCIA DE DISTINTOS ANTIOXIDANTES SOBRE
BROTACION Y CRECIMIENTO IN VITRO EN CEIBA
(*Ceiba pentandra*)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A:
LAURA ISABELA URIBE FIGUEROA**



MEXICO, D. F.

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

267576



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Prof. Raul Aguilar Caballero.

Vocal: Prof. Sobeida Sanchez Nieto.

Secretario: Prof. Teresa de Jesus Olivera Flores.

1er Suplente: Prof. Javier Plasencia de la Parra.

2º. Suplente: Prof. Maria Esther de la Rosa Duque.

Sitio donde se desarrollo el tema:

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 116 , Departamento de Bioquímica y Farmacia Edificio E , Facultad de Química U.N.A.M.

Asesor del tema:

Ing. Teresa de Jesus Olivera Flores



Teresa Olivera Flores

Sustentante:

Laura Isabela Uribe Figueroa



Laura Isabela Uribe Figueroa

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su paciencia, apoyo, cariño y afecto .

A Gerardo porque siempre me dio el mejor consejo, por sus regaños y bromas que me ayudaron a realizar de una mejor forma mi trabajo.

A mi abuela Lucy , a todos mis tios y primos, en especial a mis tíos Dimitar, Sara y Alfredo y a mis primos Lucy y Enrique por su cariño y apoyo en todo momento.

A Mayte por ser la mejor asesora, porque siempre tuvo tiempo para escucharme y por su valiosa guía para realizar este trabajo.

A todos mis compañeros del Lab. 116: Felix, Doña Alicia, Fannie, Tere, Lupita, Marina, Marte, Meche, Reyna, Anita y Karina. Sin su apoyo y enseñanzas nada de esto hubiera sido posible.

A Anabeli por ser la mejor amiga y por que siempre conté con su apoyo técnico y moral.

A mis amigas y compañeras Laura, Claudia y Mariana porque siempre conté con su amistad en los momentos mas difíciles.

A mis amigos de toda la vida :Santiago , Cubi, Alejandra, Carlos, Leo, Ruffo, Jaime, y todos los que me faltan porque siempre conté con una palabra de apoyo de su parte.

Este trabajo se lo dedico
al amor y a los sentimientos verdaderos.
Aquellos que a veces nos hacen ver
débiles y suceptibles,
pero que nos dan la fuerza
y libertad para luchar
por lo que más queremos.

INDICE

RESUMEN	1.
CAPITULO I INTRODUCCIÓN	2-3.
OBJETIVOS	4
CAPÍTULO II GENERALIDADES.....	5-24.
CAPÍTULO III MATERIAL Y MÉTODOS	25-36.
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37-59.
CAPÍTULO V CONCLUSIONES	60 y 61.
CAPÍTULO VI RECOMENDACIONES	62.
CAPÍTULO VII BIBLIOGRAFIA	63-65
APÉNDICE	66-69.

RESUMEN

La Ceiba (*Ceiba pentandra*) es una especie forestal de importancia económica y ecológica para el hombre , por lo cual se requieren alternativas como la micropropagación para su reproducción a gran escala.

Uno de los principales problemas para el lograr la micropropagación de esta especie forestal es la oxidación prematura de sus tejidos.

En este trabajo se buscó establecer, las condiciones propicias (cultivo aséptico, medio de cultivo, fitorreguladores y antioxidantes) para el cultivo *in vitro* de *Ceiba pentandra*, así como el efecto de distintos antioxidantes como el ácido ascórbico , ácido cítrico y pirogalol, en el crecimiento y la inducción de brotes adventicios a partir de yemas de la misma.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La Ceiba (*Ceiba pentandra*) es uno de los árboles más grandes y apreciados en América Tropical. De esta especie se obtienen varios productos de utilidad para el hombre como: madera suave, fibra algodonosa, aceite y es una fuente importante de celulosa para la producción de papel. Así mismo es uno de los árboles que tiene mejor adaptación en las selvas tropicales.

Debido a la importancia económica y ecológica de esta especie, se han buscado alternativas para su propagación masiva, ya que la germinación de sus semillas es en ocasiones difícil y lenta, además que pueden presentar problemas fitosanitarios.

Una de las alternativas es el cultivo de tejidos, técnica mediante la cual se busca obtener plantas completas y genéticamente idénticas a partir del cultivo de órganos, tejidos o células vegetales en un medio nutritivo y bajo condiciones controladas.

Se ha observado que una de las limitantes en el cultivo de tejidos de especies forestales es la oxidación de tejido, debido a la liberación de sustancias fenólicas de la superficie de los explantes. Esta oxidación puede debilitar a la planta y provocar su muerte.

En este trabajo de tesis se buscó encontrar un medio de cultivo apropiado para la brotación múltiple y el crecimiento de la *Ceiba pentandra* en el cual la oxidación del explante sea mínima, para lo cual el trabajo experimental se centró en la búsqueda del antioxidante ideal para esta especie, es decir aquella sustancia en el medio de cultivo que logre absorber de manera eficaz los compuestos fenólicos y no afecte en el crecimiento de la planta.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

Establecer los componentes de un medio de cultivo para el crecimiento e inducción de brotación *in vitro* de *Ceiba pentandra*, en el cual la oxidación de tejido sea mínima.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Establecer el cultivo aséptico *in vitro* de la Ceiba.
2. Conocer el medio apropiado para el crecimiento de la Ceiba y la concentración adecuada de reguladores de crecimiento para su establecimiento y brotación a partir de yemas.
3. Evaluar el efecto de distintos antioxidantes y su concentración para evitar la oxidación del explante.

CAPÍTULO II

GENERALIDADES

1. GENERALIDADES DE LA PLANTA.

1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA CEIBA.

La Ceiba pertenece a la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Vegetal

División: Espermatofita

Subdivisión: Angiospermas

Clase: Dicotiledoneas

Orden: Malvales

Familia: Bombacaceae

Género: Ceiba

Especie: pentandra

Nombre científico:

Ceiba pentandra (L.) Gaertn.

Sinónimos:

Bombax ceiba, *Bombax pentandrum*, *Ceiba casearia*, *Eriodendron anfractuosum*, *Eriodendron occidentale*.

Nombre Común:

El nombre más comúnmente utilizado en toda su área de distribución es el de Ceiba, sin embargo en algunos lugares de nuestro país se le conoce con los siguientes nombres:

Pochote (Jal., Mich., Gro., Oax., Ver., Tab., Camp.)

Yaxché, piim, (maya, Yuc.)

Únup (huasteco, S.L.P.)

Cuypishtin (popoluca, Ver.)

li-mis-gash-pupi (chontal, Oax)

pishtin (Chis)

púchute (totonaco, Ver.)

Tunuum (mixeco, Oax)

Yaga-xeni (zapoteco, Oax)

Así mismo en otros países se le denomina como:

Kapok tree (Islas Vírgenes, EUA)

Cotton-tree (Honduras Británicas)

Kumaka (Guayana Británica)

Fromager (Martinica, Guayana Francesa)

Bois cotton, kapokier (Guayana Francesa)

Katoenboom, katumbom, kapokboo (Antillas Holandesas)

Kankantrie, kaddo bakkoe (Surinam)

Samama, mai das arvores, cyyba, mocmayn (Brasil)

1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La Ceiba es un árbol monopódico de crecimiento rápido, que llega alcanzar una altura de cuarenta metros y con un diámetro aproximado (d.a.p), hasta de tres metros, tronco con contrafuertes grandes y bien desarrollados cubierto por espinas gruesas, cónicas de 1/8 - 1 pulgadas de largo, su copa es

redondeada y tiene pocas ramas muy gruesas, horizontales y torcidas, en árboles jóvenes las ramas se encuentran dispuestas en verticilos. (19).

1.2.1. CORTEZA

La corteza externa puede ser lisa hasta ligeramente fisurada, de color gris a verdosa, con pequeños poros protuberantes suberificados pálidos. La corteza interior es gruesa, de color castaño claro con numerosas expansiones de parénquima granulosa y se observa la presencia de numerosas fibras. (13)

1.2.2. HOJAS

Las hojas son alternas, presentan yemas de 7 a 10 mm, ovoides, agudas y cubiertas por numerosas escamas ovadas, densamente aterciopeladas. Tienen 2 estípulas caedizas de color amarillento. Se encuentran dispuestas en espiral, aglomeradas en las puntas de las ramas, digitado-compuestas, de 11 a 40 cm de largo incluyendo el peciolo, son delgadas, de punta corta en la base y en el ápice



Figura 1. Disposición de las hojas de *Ceiba pentandra* . Tomado de ref. 19.

y presentan borde liso. (Figura 1)

El haz presenta una coloración de verde brillante a verde oscuro, mientras que el envés es color verde mate. Los árboles pierden su follaje en su totalidad al inicio de la época seca, antes de la floración que ocurre entre enero y marzo y lo renuevan un poco después (19,13,22).

1.2.3 FLORES

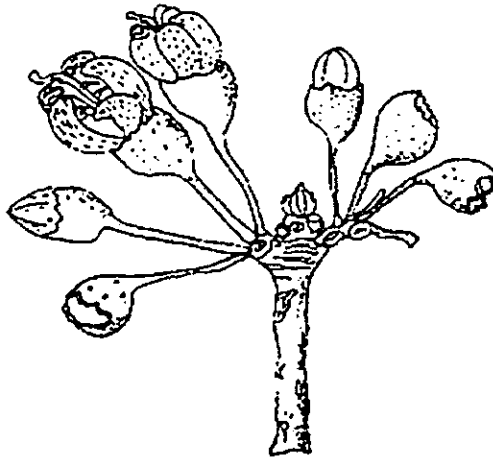


Fig. 2 Características de la flor de Ceiba pentandra. Tomado de la ref. 19.

Las flores nacen en grandes cantidades en racimos laterales durante el invierno y al inicio de la primavera. Se encuentran en fascículos de 4 a 8 cm de largo, con pedúnculos de 1.5 a 3 cm de largo. Son radialmente simétricas, perfumadas y con un cáliz en forma de cúpula color verde pardusco de 1.5 a 2 cm de largo, grueso y carnoso. Los pétalos son amarillos o dorados y se encuentran densamente cubiertos de pelos sedosos.

Estas flores presentan cinco estambres apenas excediendo en largo a los pétalos cuando la flor se encuentra abierta, están unidos en la base en un tubo corto grueso que está a su vez fusionado a la base de los pétalos; así mismo existen filamentos rojos y anteras amarillas muy grandes y torcidas. El ovario súpero está íntimamente rodeado por el tubo estaminal 5 locular, tiene el estilo largo y curvo cerca del ápice y el estigma es pardo y ancho (19). La figura 2 muestra las características de la flor.

1.2.4. FRUTOS

Cápsulas ovoides, penta-valvadas de 8 x 4.5 a 14 x 7 cm, con el cáliz persistente, péndulas, pardo morenas, con algunos pelos amarillentos. Presentan numerosas semillas redondas, de 4 a 8 mm de largo, negras,

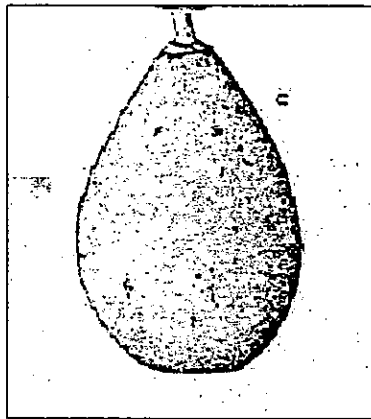


Figura 3. Esquema de un fruto de Ceiba pentandra. Tomado de ref. 19.

rodeadas de una densa masa de fibras lanosas de color grisáceo.(13).

1.3 DISTRIBUCIÓN

Se encuentra distribuida casi a todo lo largo de las Antillas, desde Cuba y Jamaica hasta Trinidad y Tobago y las Antillas Holandesas. Se han introducido en Bermuda y las Bahamas así como en el sur de Florida y California. Está ampliamente distribuida, abarca desde México hasta Ecuador, e incluye Brasil y las Guayanas. Así mismo crece en los trópicos de Africa y Asia (13).

En nuestro país se encuentra en la vertiente del Golfo desde el sur de Tamaulipas hasta la península de Yucatán y Quintana Roo mientras que en el Pacífico la encontramos desde Sonora hasta Chiapas. (Ver Figura 4) (19).



Figura 4. Mapa que muestra la distribución de la Ceiba en la República Mexicana. Tomado de ref.19.

1.4 ECOLOGÍA

Forma parte de las Selvas altas perennifolias a medianas subcaducifolias, presentándose principalmente en áreas perturbadas; se desarrolla en una gran variedad de condiciones edáficas, desde suelos arenosos con drenaje muy rápido hasta suelos arcillosos, inundables parte del año (19).

1.5 PRINCIPALES PRODUCTOS Y UTILIZACIÓN

Varios productos se obtienen de esta especie. La madera es suave y liviana, tiene un peso específico de 0.23. Se seca al aire lentamente y esto ocasiona escasos defectos debido al secado. La reacción de la madera de la Ceiba a las máquinas utilizadas para elaborar productos es como sigue: el cepillado, lijado y la resistencia a las rajaduras por tornillos son excelentes; el moldeado y el taladrado son deficientes; el torneado es regular y el escopleado es regular. (13)

Esta madera se utiliza para fabricar canoas, balsas, salvavidas, acuaplanos, aeromodelos, flotadores, centros para madera terciada, cajas de empaque, artículos torneados, cabos para cerillos, maquetas, muebles rústicos y juguetes. (18)

Se recomienda para la elaboración de pulpa para papel, papel secante, acabados de interiores y en general para todo aquello en que se requiere madera ligera y fácil de trabajar.

La fibra algodonosa que rodea a las semillas recibe el nombre de "kapok" y es uno de los productos más importantes de esta especie. Es una fibra delgada, liviana elástica y no se comprime bajo presión. Debido a estas características y a sus cualidades aislantes, durante la última guerra se utilizaba para forrar sacos de dormir y se consideró como material estratégico. Hoy en día se utiliza como aislante térmico y acústico en cámaras frigoríficas y aviones. También se emplea para rellenar colchones, almohadas, salvavidas, chamarras, chalecos salvavidas, flotadores y boyas. (13,18)

De las semillas se ha extraído un aceite propio para fabricar jabones y margarinas. Las proteínas que contienen las semillas se pueden emplear para la fabricación de adhesivos.

La infusión que se obtiene del cocimiento de la corteza se utiliza en medicina tradicional como antiespasmódico, emético y diurético. En algunos países de América Latina, la goma que mana del tronco se usa como remedio de algunas enfermedades intestinales. Así mismo, se ha observado que de la planta se pueden extraer compuestos de características astringentes y emolientes. Incluso se ha encontrado que las hojas de la Ceiba contienen un alto contenido en beta-carotenos, los cuales podrían extraerse para obtención de vitamina A (18,21).

Estas propiedades podrían ser analizadas a profundidad, para obtener algún principio activo útil en la industria farmacéutica.

La ceiba es una especie protegida por el hombre y se encuentra con gran frecuencia en las áreas dedicadas a la agricultura o ganadería como árbol de sombra. Es utilizada como planta de ornato en el centro de parques y plazas públicas por su hermosura y debido a que proporciona excelente sombra.

2. Micropropagación.

La micropropagación es una técnica mediante la cual, se busca obtener una planta completa a partir de pequeñas porciones de tejido, órganos o células (explante) "cultivadas" en un medio enriquecido con los nutrientes apropiados y bajo condiciones asépticas controladas. Esta técnica, se fundamenta en la totipotencia de las plantas, que es la propiedad de todas las células vegetativas de contener toda la información genética necesaria para regenerar al organismo completo. (15,28)

2.1 HISTORIA.

Esta técnica tuvo su origen a principios del siglo, en 1902 en Alemania, donde el fisiólogo vegetal Haberlandt estableció los principios biológicos del cultivo de tejidos. Sin embargo, estas investigaciones fracasaron ya que Haberlandt nunca demostró sus logros sobre la multiplicación celular de sus explantes. (28).

En 1939 Nobecourt en Francia y White en Estados Unidos, publicaron los primeros resultados sobre el cultivo de tejidos de zanahoria. Posteriormente, en 1952 Morel y Martin fueron los primeros investigadores en lograr la obtención de plantas completas de papa libres de virus y fue hasta 1955

cuando Skoog y sus colaboradores descubrieron las citokinas y el control hormonal de la regeneración de tallos y raíces en tabaco, lo que proporcionó el principio en el que se basa hasta hoy la micropropagación. (10,15). Posteriormente varios grupos de investigación se dedicaron a formular distintos medios de cultivo hasta que en 1962 Murashige y Skoog desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron un crecimiento rápido en callo de tabaco y la composición de este medio se utiliza ampliamente hoy en día. (15).

Según Robert y Loyola (1985), en nuestro país las actividades en este campo se iniciaron en 1970 a raíz de la firma de un Convenio de Colaboración Científica entre México y Japón, que trajo a varios investigadores japoneses al Colegio de Postgraduados en Chapingo y posteriormente la Facultad de Química comenzó a utilizar estas técnicas como un nuevo método para el apoyo de la investigación bioquímica en plantas.

2.2 USOS DE LA MICROPROPAGACIÓN.

La micropropagación se utiliza principalmente para la propagación rápida en masa de clones y para el desarrollo, mantenimiento y distribución de clones específicos sin problemas de tipo fitosanitario. Su empleo en la multiplicación vegetativa y en la producción de plantas de importancia económica, libres de patógenos, puede tener repercusiones económicas importantes. Además, la variabilidad genética para el fitomejoramiento tradicional se puede incrementar por medio de la clonación somática y la mutagénesis de células somáticas. Así mismo, debido a los múltiples problemas ecológicos del mundo

actual, la micropropagación surge como una nueva alternativa para las plantas en peligro de extinción. (10,17).

2.3 ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

Se reconocen primordialmente 4 etapas en el proceso de la micropropagación, estas etapas son:

1. Etapa cero o pretratamiento.
2. Establecimiento
3. Multiplicación
4. Pretransplante
5. Pase a suelo.

2.3.1. ETAPA CERO O PRETRATAMIENTO.

En esta etapa, los explantes se colocan inicialmente en un medio de cultivo con sales inorgánicas y azúcar, pero con una concentración muy baja de hormonas o sin ellas. Esta etapa sirve para ver la respuesta de las plantas al medio de cultivo y su adaptación al mismo. Es una medida apropiada para observar si los explantes contienen sustancias fenólicas o de otro tipo que exudan hacia el medio de cultivo e inhiben el crecimiento de los mismos (1,10).

2.3.2. ESTABLECIMIENTO.

En esta etapa lo que se busca es establecer un explante estéril en un medio de cultivo específico. Para que el establecimiento tenga éxito, deben tomarse en cuenta diversos factores como: la selección del explante, la eliminación de contaminantes del mismo y las condiciones de cultivo, que implican el tipo de medio, la luz y la temperatura. (10,15)

Para seleccionar un explante se debe escoger el que se adecue al tipo de método que se va a emplear. Los tejidos más jóvenes, como las puntas de brotes terminales o axilares se regeneran mejor que otros tejidos del tallo más viejo, esto cuando se busca obtener una organogénesis directa. Para obtener callo, generalmente se utilizan hojas, tallos e incluso raíces.

2.3.2.1. ESTERILIZACIÓN

Se necesita contar con un método de esterilización eficiente para eliminar hongos y bacterias del explante. Generalmente, se utilizan desinfectantes a bajas concentraciones como el hipoclorito de sodio, alcoholes (etílico, metílico o isopropílico) el Tween 20 y un bactericida a base de una solución coloidal de plata (como el Microdín). El explante se expone a la mezcla de algunas de estas sustancias para después ser enjuagado varias veces antes de ser cultivado en el medio de cultivo. Este método debe ser efectivo para la eliminación de los organismos indeseables, pero no debe afectar la capacidad de regeneración del explante. Así mismo, todo el material de cristalería que esté en contacto con el explante debe seguir un proceso de esterilización, que se lleva a cabo utilizando autoclaves que actúan con vapor a presión (10,15)

2.3.2.2.MEDIO DE CULTIVO.

El medio de cultivo tiene la función de proporcionar los nutrientes básicos para el crecimiento continuo de los explantes así como dirigir el crecimiento y desarrollo de la planta mediante un control hormonal. El control hormonal en la micropropagación se efectúa por dos tipos de hormonas principalmente: las auxinas y las citokininas. (10).

Las auxinas son compuestos involucrados en la división celular, en la elongación de la planta y en la síntesis de la pared celular. Las principales auxinas son el ácido indolacético (AIA), el ácido indolbutírico (AIB), el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Las citokininas son sustancias que se utilizan para la inducción de brotes adventicios, son importantes para la división celular. Las citokininas comúnmente utilizadas son: la 6-benzoaminopurina (BAP), la kinetina, la 2-isopentiladenina (2-ip) y la zeatina. (4).

Además de los componentes hormonales, un medio de cultivo necesita de sales inorgánicas que proporcionan los macroelementos (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio) y microelementos (boro, cobalto, cobre, manganeso, yodo, hierro y zinc) de las plantas.

Se requiere de una fuente de carbono, siendo la sacarosa a una concentración del 2 al 3 %, el compuesto más utilizado. También se adicionan vitaminas con la finalidad de estimular procesos de crecimiento específicos. Se recomienda adicionar al medio un antioxidante que evite que algunos compuestos fenólicos

secretados por las plantas afecten su crecimiento oxidándolas de forma prematura.

Un medio de cultivo puede ser sólido o líquido y necesita algún material inerte de soporte. En los medios sólidos y semisólidos el agar es el material de soporte más ampliamente utilizado, pues provee al medio un excelente gel húmedo que sirve como soporte para el inóculo. Otros agentes gelificantes utilizados son la poliacrilamida, la silicagel y el Gelrite (Merck). Este último, es un heteropolisacárido aniónico natural que forma geles semejantes al agar, quebradizos y rígidos en presencia de sales solubles. Es uno de los más utilizados debido a que se puede usar a una concentración menor a la que se utiliza para el agar (cerca de la mitad), además de que son geles de mayor transparencia y que solidifican más rápidamente. (20).

2.3.3. ETAPA DE MULTIPLICACIÓN.

En esta etapa, lo que se busca es generar el mayor número de brotes adventicios a partir de los explantes obtenidos de la etapa de establecimiento. Para lograr este objetivo, se puede modificar el medio aumentando la concentración de citokininas y disminuyendo en proporción las auxinas. Así mismo, se deben realizar subcultivos periódicos para evitar el deterioro de los propágulos y se debe cambiar el tamaño de los frascos contenedores considerando el tamaño del explante (10).

2.3.4. PRETRASPLANTE.

Durante esta etapa se prepara a las plantas para transplantarlas del medio artificial heterótrofo a tierra estéril para su adaptación adecuada en el invernadero y para su existencia en forma autótrofa. Para lograr esto, generalmente se induce la formación de raíces y el alargamiento de los explantes, así como la eliminación de aquellas plantas anormales, pequeñas y enfermas.

2.3.5. TRASPLANTE.

En esta fase, las plantas enraizadas se sacan del recipiente de cultivo, se lava el agar que tienen adherido para remover una fuente de potencial contaminación y se trasplantan a una mezcla de suelo estéril. Se deben proteger las plantas de la desecación colocándolas en macetas tapadas, en un invernadero a temperatura y humedad controlada. Se recomienda antes del trasplante, realizar un lavado de los explantes con algún fungicida o bactericida para asegurar que las plantas no sean invadidas por agentes patógenos (15).

2.4 MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES FORESTALES.

Hoy en día, se ha enfocado la atención de los científicos en los problemas de diversidad biológica, particularmente enfocado a los bosques tropicales. Se tienen estimaciones que se han perdido 20.4 millones de hectáreas de bosques por año (12). La depredación de éstos, se debe a la deforestación que se lleva a cabo en diversas zonas para obtener terrenos para la agricultura, ganadería y desarrollo industrial entre otros.

Las principales medidas que se han tomado para la conservación tienden a concentrarse en el establecimiento de áreas protegidas, aunque ha surgido la idea de la generación de bancos de genes de especies forestales. (12).

Debido a la importancia económica y ecológica de los árboles, ha surgido la necesidad de que se busquen alternativas para la propagación masiva de los mismos. Una de las alternativas que surge para solucionar esto es la micropropagación.

En la literatura se ha reportado la propagación vegetativa de distintas especies de árboles como *Alnus glutinosa*, *Salix alba*, *Pseudotsuga menziesii*, *Platanus orientalis*, *Quercus robusta*, *Ulmus sp*, entre otras especies de interés comercial (4). Así mismo, Williams, et.al. (27), describe interacciones entre diversos factores como: auxinas, pH, luz y su efecto en una gran variedad de especies forestales en Australia.

Los explantes utilizados en la mayoría de los estudios realizados hasta ahora incluyen segmentos nodales o internodales, yemas axilares y apicales así como tejidos subapicales (23). La mayoría de las especies fueron propagadas por el enraizamiento de yemas o por la propagación de brotes. Estos métodos solamente son viables o pueden considerarse candidatos para el cultivo de tejidos cuando la propagación convencional por semillas o injertos es lenta, difícil o cuando se busca un mejoramiento clonal (eliminación de patógenos, rejuvenecimiento) (4).

El cultivo *in vitro* de árboles tropicales se inició en algunos países asiáticos al final de la década de los setenta. Los resultados reportados han sido satisfactorios en cuanto a organogénesis y desarrollo de plantas tropicales en las siguientes especies: *Acacia*, *Ailanthus*, *Azadirachta*, *Carica*, *Citrus*, *Cocos*, *Euxalyptus*, *Gleditschia*, *Hevea*, *Morus*, *Salix*, *Santalum*, *Tectona*, *Tamarindus*, *Zizyphus* entre otras.(23)

Sin embargo, el desarrollo de protocolos para la propagación de especies forestales no se ha desarrollado de igual forma que para las demás especies vegetales. Esto debido a que generalmente las células de especies forestales tienden a crecer de manera más lenta. Así mismo, se ha detectado que los tejidos viejos de especies forestales (a diferencia de los jóvenes que enfocan su metabolismo a la producción de metabolitos primarios para su crecimiento), excretan fenoles tóxicos que matan a los explantes de manera prematura. Sin embargo, muchos grupos de investigación alrededor del mundo, sobre todo en los países donde los árboles tienen una gran importancia económica y ecológica, están abriendo líneas de investigación en esta área (6,23).

2.5. ASPECTOS GENERALES DEL CULTIVO *IN VITRO* DE MERISTEMOS.

Un meristemo se define como aquella región de la planta donde se efectúa una división celular activa y por lo tanto hay formación continua de tejido. Esta región se encuentra principalmente en las yemas apicales o axilares de la planta y en las raíces (1).

El método de propagación por medio de meristemos es, generalmente muy elaborado, debido a los múltiples pasos de esterilización y subcultivo. Sin

embargo es uno de los más utilizados para la obtención de plantas libres de patógenos (6).

Al cultivar un meristemo en un medio adecuado, éstos pueden regenerar plantulas completas más rápidamente que los tejidos de otras fuentes; estas plantas regeneradas usualmente retienen las características genéticas de los progenitores, lo que se debe a la naturaleza diploide de la célula meristemática (17).

Una de las alternativas de más éxito para erradicar virus sistémicos, es el cultivo de meristemos apicales, combinados con quimioterapia o con tratamientos de calor. Estos métodos pueden erradicar además de los virus, hongos y bacterias patógenas. Los meristemos se inoculan en los tubos de cultivo, y a los pocos días si se observa proliferación de microorganismos se deben eliminar dejando los que se mantienen sanos (15).

Se ha observado que utilizando la concentración adecuada de citokininas, los meristemos se desarrollan adecuadamente formando brotes adventicios. Estas hormonas se utilizan para sobreponer la dominancia apical y provocar la aparición de brotes laterales (14).

Este método es uno de los más apropiados para árboles maderables ya que es el más sencillo y mantiene una estabilidad genética mayor que en la embriogénesis.

3. ANTIOXIDANTES EN LA MICROPROPAGACIÓN

Al realizar un cultivo in vitro, el medio de cultivo actúa como receptáculo de los productos de excreción de las células que crecen en él. Existen muchas plantas que son ricas en compuestos polifenólicos. Cuando este tipo de plantas sufren una escisión o daño, liberan estos compuestos que pueden oxidarse por la acción de polifenoloxidasas provocando que el tejido tome una coloración café o negra. Los productos de oxidación inhiben actividad enzimática, matan al explante y oscurecen el medio de cultivo. Esta problemática es muy frecuente en la micropropagación de especies forestales (14,4).

Algunos de los procedimientos para evitar la oxidación son:

- 1) Añadir antioxidantes al medio de cultivo
- 2) Remojar los explantes en una solución de antioxidantes antes de cultivarlo.
- 3) Incubar el explante en su etapa primaria bajo luz reducida.
- 4) Realizar subcultivos frecuentes para evitar la oxidación (14).

Los antioxidantes comúnmente utilizados en la micropropagación son: el ácido ascórbico, ácido cítrico y cisteína, además de aquellos compuestos con alta afinidad por sustancias fenólicas como la polivinilpirrolidona, pirogalol y carbón activado. (2, 6).

El pirogalol, es un compuesto perteneciente a la familia de las proantocianidinas, de origen fenólico provenientes de algunas plantas. Estos compuestos tienen la capacidad de formar complejos con proteínas ricas en prolina y mucopolisacáridos. (11).

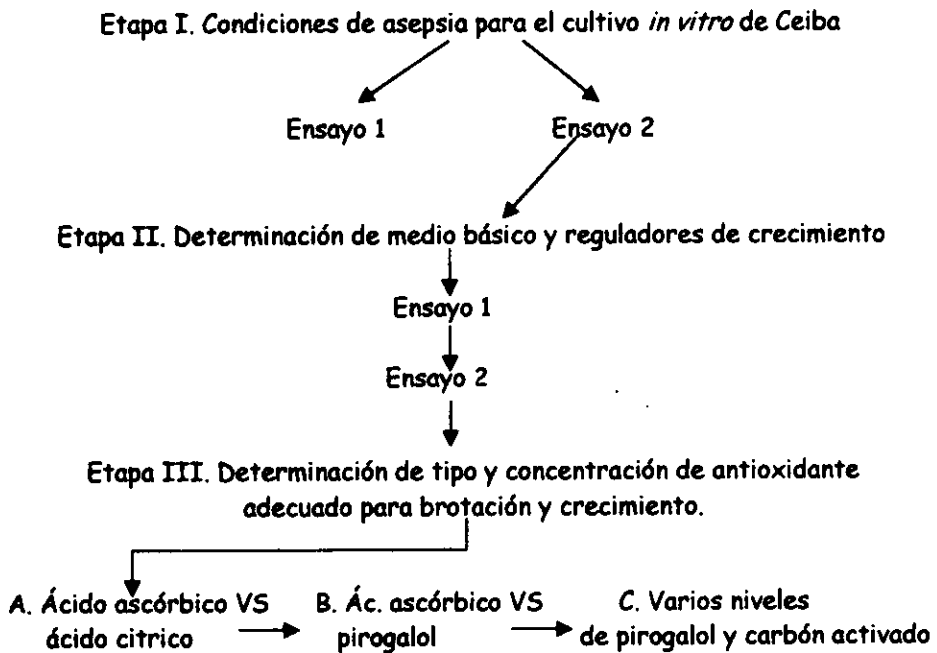
El carbón activado además de ser un buen adsorbente ya que atrapa compuestos fenólicos, auxinas y citokininas, presenta la capacidad de activar y promover la elongación de brotes en *Picea glauca* y en *Annanas comosus* (25,29).

El ácido ascórbico es una lactona de un azúcar-ácido. Es un potente reductor, que pierde con facilidad átomos de hidrógeno para transformarse en ácido deshidroascórbico y es un compuesto sensible a la temperatura (16). Mientras que, el ácido cítrico es un ácido carboxílico ampliamente distribuido en tejidos animales y vegetales cuyos grupos polares ácidos e hidroxilo le permiten tener propiedades antioxidantes, además de ser un agente secuestrador de metales traza. La cisteína es un aminoácido polar que contiene un grupo sulfhidrilo, el cual, es muy reactivo y extremadamente susceptible a la oxidación a disulfuro por el oxígeno atmosférico en presencia de sales de hierro u a otro oxidante suave.

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo, la fase experimental se dividió en tres etapas principales: I. Condiciones de asepsia para el cultivo *in vitro* de Ceiba II. Determinación de Medio Básico y de reguladores de crecimiento y III. Determinación de tipo y concentración de antioxidante apropiados para brotación y crecimiento.



3.1 Materiales

3.1.1 Fuente de explantes.

Las plantas donadoras de explantes fueron obtenidas a partir de la semilla botánica de un árbol madre de entre 20 y 30 metros de altura, que fue colectada el 17 de abril de 1997 en el municipio de Temixtepec, Veracruz. Esta semilla fue tratada con peróxido de hidrógeno al 3 % como método de escarificación (suavizar la parte externa de la semilla para inducir una germinación más rápida). Las plantas obtenidas fueron trasladadas al invernadero donde se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y humedad.

3.1.2. Preparación de medios de cultivo.

Los medios de cultivo básicos utilizados estuvieron compuestos por las sales inorgánicas del medio Murashigue & Skoog (1962) conocido como MS, el medio de Lloyd (1981), conocido como WPM y el medio Heller (1953), suplementados con diferentes mezclas de vitaminas y aminoácidos así como de diversos reguladores de crecimiento según se indica en cada experimento.

Estos medios se prepararon a partir de soluciones madre según las concentraciones mencionadas en el Apéndice, como fuente de carbono se utilizó sacarosa (azúcar comercial) al 3 % y se utilizó como agente gelificante Gellan (Research Organics Inc.) al 2.5 %, el pH se ajustó a 5.7 +/- 1 con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N y ácido clorhídrico (HCL) 0.1 N, se aforó con agua desionizada para obtener el volumen deseado.

El medio de cultivo se vació en tubos de ensaye y en frascos de vidrio de 45 y/o 55 ml. con tapa y 10 ml de medio respectivamente.

Los tubos y frascos tapados se esterilizaron en autoclave vertical a una temperatura de 121 °C y 1.2 kg/cm² de presión durante dieciocho minutos. Posteriormente se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente.

3.1.3. Condiciones de incubación

Todos los cultivos *in vitro* se mantuvieron bajo un ambiente controlado en un cuarto de incubación. En este cuarto de incubación la temperatura promedio fue de 27 °C durante el día y 25 °C durante la noche, sometiendo los explantes a un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, con luz de día, cuya intensidad lumínica fué de 29 $\mu\text{Em}^2\text{s}$.

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. Etapa I.

Condiciones de asepsia para el cultivo *in vitro* de Ceiba.

Para establecer un cultivo aséptico se debe realizar la desinfección del material vegetativo, para lo cual se empleó:

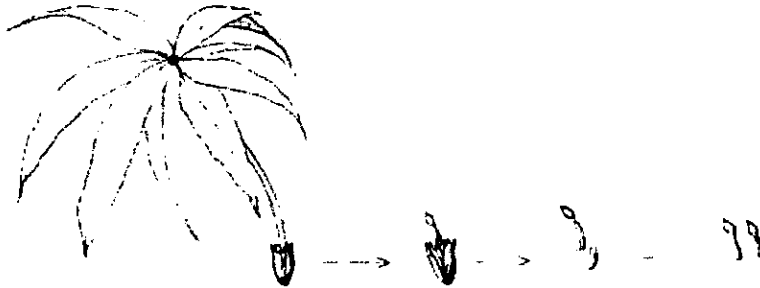
Ensayo 1

1. De las plantas donadoras mantenidas en el invernadero, se extrajeron la mayor cantidad de yemas tanto apicales como axilares, seleccionando las más jóvenes y aquellas en mejores condiciones fitosanitarias.
2. El material seleccionado se desinfectó introduciéndolo en una solución con detergente comercial y agua corriente durante veinte minutos.
3. Posteriormente, el material se trasladó a la campana de flujo laminar donde se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador comercial, Cloralex) al 15 % (v/v), con 1.6 mL^{-1} de Tween 20 y 4 mL^{-1} de Microdín durante siete minutos.
4. Se enjuagó 3 a 4 veces por 4 minutos con agua desionizada estéril para posteriormente proceder a la siembra.

Antes de proceder a la siembra en los medios de cultivo apropiados, el material de laboratorio (pinzas, bisturí y cajas Petri) se esterilizaron en autoclave durante treinta minutos a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ y 1.2 kg/cm^2 de presión.

Para realizar la siembra, la yema se prepara removiendo hojas laterales y brotes mayores a 1 cm procurando no maltratar el resto del explante. Posteriormente, se removieron la bractea (hoja pequeña semidesarrollada que envuelve o protege la flor o la rama de alguna inflorescencia o yema) y las mayoría de las hojas que envuelven a las yemas, procurando separar completamente ésta última de la base , pues este tejido no es indispensable y puede ocasionar la muerte del explante al oxidarse. Este procedimiento se realizó utilizando microscopio estereoscópico o lupa de aumento para tener una mayor precisión en los cortes.

El procedimiento se muestra en el esquema 3.1:



Esquema 3.1. Procedimiento para la obtención de los explantes a sembrar.

Ensayo 2.

Debido a la agresividad de las sustancias utilizadas en la esterilización para el tejido, se realizó un segundo ensayo en el cual se siguió el mismo procedimiento anteriormente mencionada pero realizando las siguientes modificaciones a la solución desinfectante: el hipoclorito de sodio se añadió al 10 %, se eliminó el uso de Tween 20 y se adicionaron 3 mL^{-1} de Microdín. Se realizó un enjuague del material seleccionado en esta solución durante diez minutos.

3.2.2. Etapa II

Determinación de medio básico y reguladores de crecimiento.

3.2.2.1. Ensayo 1

El material obtenido de los bioensayos de la etapa I para obtener los explantes libres de patógenos, se sembraron en tres medios distintos:

Medio MS adicionado con glicina y una mezcla de vitaminas conocida como R-2 (ver Apéndice).

Medio WPM adicionado con glicina y vitaminas WPM (ver Apéndice).

Medio Heller.

Estos medios se adicionaron con 1.3 mgL^{-1} de BAP y 0.23 mgL^{-1} de 2ip como reguladores de crecimiento. Así mismo, se suplementaron con 100 mgL^{-1} de ácido ascórbico como antioxidante.

Se sembraron 10 repeticiones de cada uno, se tomó la longitud del brote antes de la siembra y se enumeraron. Se evaluaron los brotes considerando el aumento de tamaño y el grado de oxidación en los mismos. La evaluación se realizó cada 7 días durante 30 días.

3.2.2.2. Ensayo 2.

Con base en los resultados obtenidos en el ensayo anterior se descartó el medio básico de Heller debido a que resultó poco efectivo para el crecimiento de los explantes y se procedió a realizar tratamientos con reguladores de crecimiento para buscar la concentración idónea para la inducción de brotación y crecimiento, utilizando el medio MS y el WPM.

Los tratamientos utilizados se presentan en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Medios de cultivo probados para la inducción de brotes de Ceiba, variando las concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento.

Medio	mgL ⁻¹ de BAP	mgL ⁻¹ 2ip	mgL ⁻¹ de AIB	mgL ⁻¹ de AG ₃
MS I	0.206	0.046	_____	_____
MS II	0.144	0.036	_____	_____
MS III	0.02	_____	0.02	0.002
WPM I	0.206	0.046	_____	_____
WPM II	0.144	0.036	_____	_____
WPM III	0.02	_____	0.02	0.02

A estos medios se les adicionó 100 mgL⁻¹ de ácido ascórbico como antioxidante. Los brotes en esta fase, se evaluaron cada tercer día, midiendo tamaño de brote, número de brotes y oxidación.

3.2.3. ETAPA III

Determinación de tipo y concentración de antioxidantes adecuados para brotación y crecimiento.

3.2.3.1.. Ensayo A

Con base en los resultados obtenidos en el ensayo anterior se planteó determinar si la causa de la oxidación que se observaba en los brotes se debía a la utilización del tipo y/o una concentración inadecuada de antioxidante o a las sales inorgánicas de los medios básicos utilizados. Por lo tanto, se probaron

dos medios de cultivo básicos variando el agente antioxidante en la Tabla 3.2 se muestran los seis diferentes tratamientos utilizados.

Tabla 3.2. Variación en la concentración y tipo de antioxidante que se añadieron a los medios básicos MS y WPM.

Medio	mgL ⁻¹ ácido ascórbico	MgL ⁻¹ ácido cítrico
WP T	100	_____
WP 1	200	150
WP 2	300	_____
MS T	100	_____
MS 1	200	150
MS 2	300	_____

Se utilizaron como reguladores de crecimiento 0.144 mgL⁻¹ de BAP y 0.036 mgL⁻¹ de 2ip. Así mismo, se agregaron al medio MS la mezcla de vitaminas R2 y para el medio WPM las vitaminas WPM.

Estos brotes se mantuvieron durante 45 días en el cuarto de incubación, y se observó crecimiento y grado de oxidación, midiendo esta última por cruces. Las observaciones se hicieron cada 3 días.

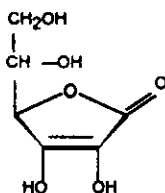
3.2.3.1 Ácido ascórbico vs pirogalol.

Con los resultados obtenidos en las etapas anteriores se observó que era necesaria la evaluación de diversos antioxidantes y de varias concentraciones

de los mismos. Para esta fase, se utilizaron dos antioxidantes distintos en estructura y funcionalidad: el ácido ascórbico y el pirogalol.

ÁCIDO ASCÓRBICO

Fórmula desarrollada:



Fórmula condensada: $C_6H_8O_6$

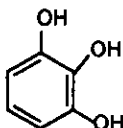
Peso molecular: 176.12

Propiedades físicas y químicas:

Cristales monoclinicos, generalmente aplanados, de sabor ácido agradable. Punto de fusión: 190-192°C. $pK_1=4.17$, $pK_2=11.57$. UV máx. 245 nm. Soluble en agua, moderadamente soluble en alcohol y glicerol. Insol. en éter, cloroformo, benceno, aceites, grasas y solventes de carácter graso. Posee un fuerte poder reductor.

PIROGALOL

Fórmula desarrollada:



Fórmula condensada: $C_6H_6O_3$

Peso molecular: 126.11

Propiedades físicas y químicas: Cristales blancos, inodoros. Punto de fusión: 131-133 °C. Venenoso. Punto de ebullición: 309°C. Soluble en agua, alcohol y éter, insoluble en benceno, cloroformo y disulfuro de carbono. Es un buen reductor y se ha utilizado para absorción de oxígeno en análisis de gases. Proviene del galato y generalmente son productos provenientes de flavonoides en plantas, taninas y lignina.

Los tratamientos realizados con los antioxidantes anteriormente mencionados se muestran en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Medios para la inducción de brotación y crecimiento en Ceiba variando el antioxidante y el medio de cultivo básico.

Medio	mgL ⁻¹ ácido ascórbico	mgL ⁻¹ pirogalol
MS a	300	_____
MS p	_____	12.5
WP a	300	_____
WP p	_____	12.5

A estos medios se adicionaron como reguladores de crecimiento 0.144 mgL⁻¹ de BAP y 0.036 mgL⁻¹ 2ip. Se utilizaron las mezclas de vitaminas para cada medio mencionadas en el ensayo anterior.

Los brotes se mantuvieron en observación en las condiciones anteriormente mencionadas y se realizaron mediciones de tamaño, oxidación y número de brotes cada tercer día. A los 21 días, se realizó un subcultivo del cual sobrevivieron pocos explantes, sobre todo del medio WPM. Para evitar la pérdida de los demás explantes se decidió aumentar la concentración de pirogalol a 25 mgL^{-1} .

3.2.3.2. Varios niveles de pirogalol vs carbón activado.

Con los ensayos realizados anteriormente, se observó la eficiencia del pirogalol como antioxidante. Se decidió realizar un experimento en el cual, se probarían varias concentraciones de pirogalol y se añadió un tratamiento utilizando carbón activado como suplemento para probar su actividad antioxidante y adsorbente.

Se utilizó como medio básico, el medio MS suplementado con vitaminas R-2, glicina y como reguladores de crecimiento 0.144 mgL^{-1} de BAP y 0.036 mgL^{-1} de Zip..

Los tratamientos utilizados se presentan en la Tabla 3.4.:

Tabla 3.4. Medios de cultivo para la inducción de brotación y crecimiento de Ceiba variando la concentración y tipo de antioxidante.

Medio	mgL^{-1} pirogalol	gL^{-1} carbón activado
MS A	19	_____
MS B	31	_____

Medio	mgL ⁻¹ pirogalol	gL ⁻¹ carbón activado
MSC	25	5
MST	25	_____

Los brotes se mantuvieron en observación, haciendo las mediciones anteriormente mencionadas. Se realizó un subcultivo a los 21 días, en el cual antes de ser cultivados, los explantes pasaron por una solución de ácido ascórbico (50 mgL⁻¹).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ETAPA I

Condiciones de asepsia para el cultivo in vitro de Ceiba.

4.1.1. Ensayo 1

El método empleado en el Ensayo 1 para la desinfección de los brotes resultó muy efectivo al encontrarse que ningún explante se contaminó, es decir tuvo una efectividad del 100 %. Sin embargo, los brotes resultaron muy afectados, observándose decoloración y muerte de algunas zonas del tejido. Esto se puede atribuir a la concentración de hipoclorito de sodio utilizada y a la utilización del Tween 20, detergente que afecta las ceras de las plantas y a las membranas celulares, lo que puede hacer más susceptible el tejido a la acción de las sustancias utilizadas para la desinfección (3).

4.1.2. Ensayo 2

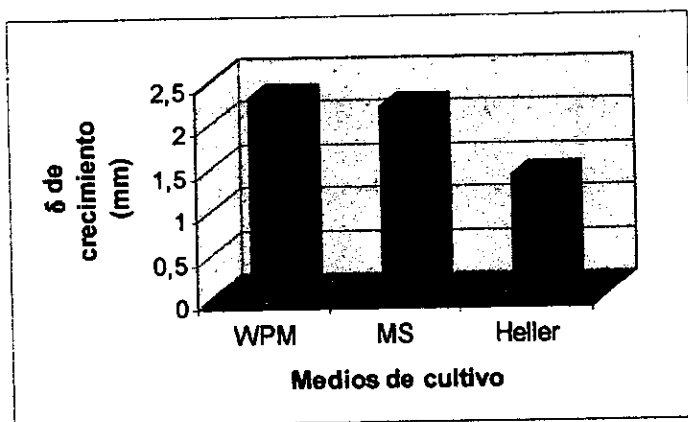
Debido a los resultados obtenidos en el ensayo 1 se decidió realizar un segundo ensayo, en el cual se disminuyó la concentración de hipoclorito de sodio y se omitió la utilización de Tween 20. Se encontró que los cambios efectuados no afectaron la efectividad del método de esterilización, ya que en todas las

repeticiones realizadas no se observó contaminación del medio de cultivo o del explante, resultando el método de esterilización al 100% eficiente.

4.2. Etapa II. Determinación de medio básico y reguladores de crecimiento.

4.2.1. Ensayo 1.

Se utilizaron 3 medios básicos: el medio MS utilizado en la mayoría de las investigaciones en cultivo de tejidos, el medio WPM que se ha utilizado para especies forestales y el medio Heller utilizado por su baja fuerza iónica (9). Los resultados obtenidos con los tres medios utilizados se muestran en la tabla 4.1 y en la gráfica 4.1:



GRÁFICA 4.1 Incremento de crecimiento después de 30 días de yemas de Ceiba sembradas in vitro en tres medios diferentes.

Tabla 4.1 Número de brotes diferenciados, delta de crecimiento y oxidación de los mismos, en tres diferentes medios.

	Medio MS	Medio WPM	Medio Heller
No. de brotes promedio diferenciados ₁	2	2	1
Oxidación ₂	++	+++	+++++

1.-No. de brotes diferenciados en la base de la yema sembrada.

2.- ++ = oxidación moderada en la base

+++ = oxidación en la base y en el explante.

+++++ = Exceso de oxidación, el explante está casi muerto.

Como podemos observar en la gráfica 4.1, los medios donde hubo mayor crecimiento fue el MS y el WPM. Mientras que, en el medio de Heller, además de presentarse un crecimiento pobre, muchos de los brotes presentaron un alto índice de oxidación ya que a los 15 días de ser cultivados, se encontraron zonas de tejido muy afectadas por la oxidación.

La ineficiencia del medio Heller en este ensayo puede deberse a los siguientes factores:

- El medio Heller (1953) contiene como única fuente de nitrógeno, el nitrato de sodio. Se ha demostrado que los nitratos son la fuente más importante de nitrógeno para las plantas cultivadas *in vitro*, pero también se ha

mencionado que es necesaria la presencia de nitrógeno en su forma reducida, es decir en forma de iones de amonio y que estos iones juegan un papel importante como reguladores en los cultivos *in vitro*. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que, la enzima nitrato reductasa, responsable del metabolismo del nitrógeno, se activa en la presencia de estos compuestos. Así mismo, la presencia de nitrógeno en su forma reducida es benéfica para la formación de pared celular y para la síntesis de factores endógenos para la división celular (9). Sin embargo, el medio Heller al carecer de sales de amonio, puede producir una disminución en la actividad de las enzimas nitrato y nitrito reductasa, ocasionando una acumulación de nitritos en el medio, los cuales son tóxicos para las plantas. Además, los medios que tienen nitratos como única fuente de nitrógeno son muy alcalinos, lo cual también puede afectar el aprovechamiento de algunas sales inorgánicas del medio provocando una deficiencia en el crecimiento de las plantas.

- A diferencia del medio MS y el WPM, el medio de Heller no contiene molibdeno. Este elemento está presente en varias enzimas como por ejemplo la nitrato reductasa. Al utilizar un medio deficiente en molibdeno la actividad de esta enzima disminuye acumulándose niveles tóxicos de nitratos.
- Este medio también contiene una alta concentración de cloruros. Los cloruros en pequeñas proporciones son esenciales para el crecimiento de las plantas ya que participan en el proceso de fotosíntesis. Sin embargo, se ha

demostrado que cuando se excede su concentración, es un compuesto tóxico para muchas plantas, afectando en especial algunas especies forestales (4).

- De los tres medios utilizados, el medio Heller es el que presenta una menor fuerza iónica, lo cual puede facilitar el transporte de las sustancias en el medio hacia las células del explante. Esto podría verse como una ventaja, sin embargo como se menciona anteriormente, la falta de algunos componentes en este medio provocan la presencia de sustancias tóxicas para el explante que, al encontrarse en un medio de poca fuerza iónica se encuentran al alcance del tejido al que pueden ocasionar daño (4,9).

Con estos resultados se decidió continuar los ensayos utilizando únicamente los medios MS y WPM en los que se observó una respuesta similar en cuanto a tamaño y oxidación de los brotes.

4.2.2. Ensayo 2.

Para observar el efecto del tipo y concentración de reguladores de crecimiento en la brotación y crecimiento de las yemas, se utilizaron los siguientes fitoreguladores: la 6-benzilaminopurina (BAP), la 2-isopentiladenina (2ip), el ácido indolacético (AIA) y el ácido giberélico (AG_3).

El BAP y el 2ip son compuestos involucrados en procesos de división celular, inducción de brotes adventicios y síntesis de proteínas.

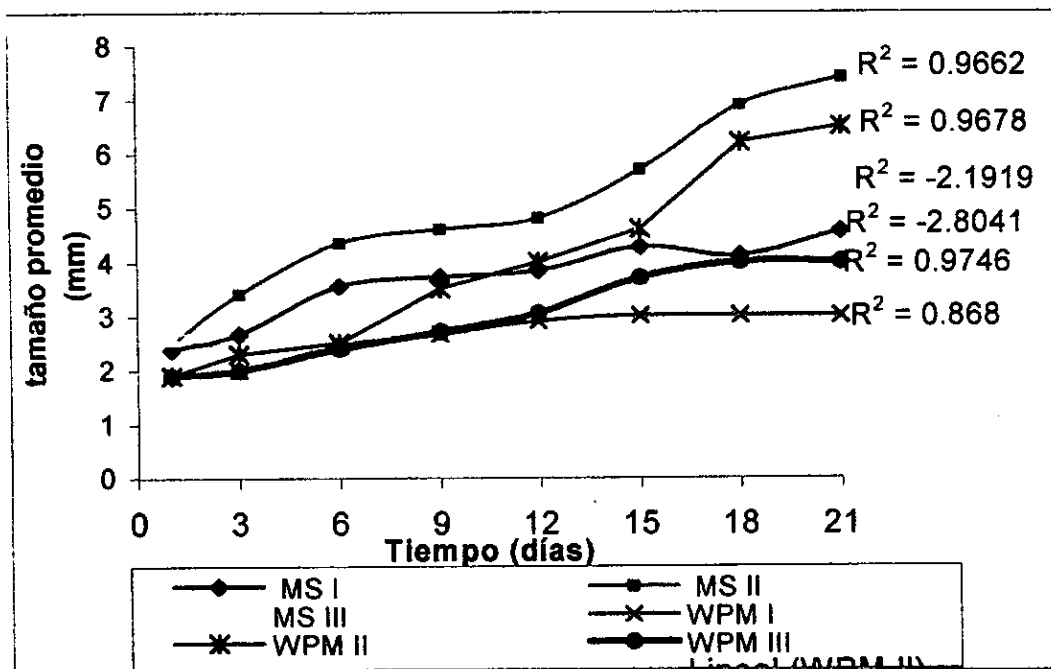
El ácido indolacético (AIA) pertenece al grupo de las auxinas, compuestos involucrados en la división celular, en la elongación de explantes y en la síntesis de pared celular.

El ácido giberélico es una sustancia relacionada al control de crecimiento celular, inducción de brotes, germinación de semillas y floración. En algunos casos se ha demostrado su efectividad para la producción de raíces (4).

El BAP es el compuesto más utilizado en el cultivo de tejidos debido a que es resistente a la esterilización en autoclave y a su potencia como citokinina. Los primeros dos compuestos se clasifican dentro del grupo de las citokininas, el AIA al grupo de las auxinas y el AG₃ a las giberelinas.

En este ensayo, se utilizaron como medios básicos el medio MS y WPM debido a que en el ensayo anterior los resultados de ambos medios fueron muy similares. Los resultados de los tratamientos con estos reguladores de crecimiento se muestran en la gráfica 4.2.

En la gráfica se puede observar que el medio MS suplementado con 0.144 mgL⁻¹ de BAP y 0.036 mgL⁻¹ de 2ip (medio MS II) muestra yemas con mayor crecimiento, además, como se muestra en la Tabla 4.2 se induce la aparición de la mayor cantidad de brotes adventicios, cerca de 2 veces más que el MS I y el WPM II aún cuando este último contiene las mismas concentración de fitoreguladores que el MS II.



GRÁFICA 4.2. Incremento del crecimiento de yemas sembradas en seis medios distintos durante 30 días. El medio MS I, MS II, MS III, que es el medio Murashige y Skoog suplementado con diferentes concentraciones de fitoreguladores. El medio WPM I, WPM II y WPM III, es el medio de Lloyd adicionado con diferentes concentraciones de fitoreguladores (ver tabla 4.2).

Tabla 4.2. Resultados de delta de crecimiento, tamaño promedio y número de brotes diferenciados después de 30 días con seis medios básicos distintos.

Medio	Regulador de crecimiento (mgL ⁻¹)	Tamaño	δ de crecimiento	No. de brotes
MS I	BAP 0.206 2ip 0.046	4.55	2.16	8
MS II	BAP 0.144 2ip 0.036	7.40	4.9	17

Medio	Regulador de crecimiento (mgL ⁻¹)	Tamaño	δ de crecimiento	No. de brotes
MS III	BAP 0.02 AG ₃ 0.002 AIB 0.02	5.22	2.6	5
WPM I	BAP 0.206 2ip 0.046	3.0	1.1	4
WPM II	BAP 0.144 2ip 0.036	6.5	4.6	8
WPM III	BAP 0.02 AG ₃ 0.002 AIB 0.02	4.0	2.1	1

* El tamaño se refiere al tamaño promedio total después de 30 días.

** δ de crecimiento se obtuvo de la diferencia entre el promedio de tamaño a los 30 días y el promedio de tamaño del día cero.

En el medio WPM suplementado con la misma concentración de reguladores de crecimiento no se observó una respuesta tan favorable como en el medio MS en cuanto a la inducción de brotes, sin embargo se observa una respuesta similar en cuanto a la δ de crecimiento. Además se observa una amplia diferencia con los medios que utilizan las otras concentraciones de hormonas.

En los otros medios, además de observarse un pobre crecimiento hay una mayor inducción de callo y se presenta una oxidación pronunciada. En los medio MS III y WPM III se observó una muerte prematura de los explantes causada probablemente por la baja concentración de reguladores de crecimiento o bien a que no fue la combinación adecuada.

Según los tratamientos utilizados, se esperaba obtener una mejor respuesta en el medio donde el BAP se encontraba en su concentración más alta. Sin embargo, como vemos en la tabla de resultados el δ de crecimiento fue casi el doble en el medio MS II y WPM II que en el MS I y WPM I, en donde se encuentra la mitad de la concentración de BAP.

Esto quizá, se deba a que los explantes tuvieron una sobreexposición al efecto de las citokinas. Según Flinn (1986) la sobreexposición al BAP y probablemente a las demás citokinas puede inducir la formación de un callo de características compactas que afecta de forma clara el crecimiento y oxidación de los explantes. Se observó que la mayoría de los brotes en los cuales hubo formación de callo, presentaban una oxidación más notable que en aquellos en donde el callo estaba ausente. Así mismo, se ha descrito que una alta concentración de citokinas provoca la formación de pequeños brotes que generalmente fallan al elongarse y se pueden volver hiperhídricos (4).

La ineficiencia del AIB para la inducción de brotes es probable que se deba a que esta sustancia es muy lábil a la temperatura de autoclave, y que al combinarse con cualquier citokina podría inducir la formación de callo, lo cual como se mencionó anteriormente afecta al tejido.

Aunque ya se conoce la concentración adecuada de reguladores de crecimiento, muchos de los brotes obtenidos mostraron una oxidación elevada. Esto provocó que muchos de los brotes adventicios que aparecieron, no lograron su crecimiento apropiado y se secaron o murieron antes de los 30 días.

4.3. Etapa III Determinación de tipo y concentración de antioxidantes adecuados para brotación y crecimiento.

4.3.1. Ensayo A. Ácido ascórbico VS ácido cítrico.

Debido a que no se puede discernir si el efecto de oxidación en los brotes esta relacionado con las sales inorgánicas del medio de cultivo o una apropiada concentración de antioxidante, se procedió a utilizar como medios básicos los medios MS y WPM, adicionados con tres concentraciones de ácido ascórbico, y en uno de los medios también se adicionó ácido cítrico para observar su efecto.

Los resultados se muestran en la tabla 4.3. y en la gráfica 4.3.

Tabla 4.3 Tamaño promedio, delta de crecimiento y oxidación observadas en yemas cultivadas en dos medios de cultivo distintos con variación en el tipo y la concentración de antioxidante.

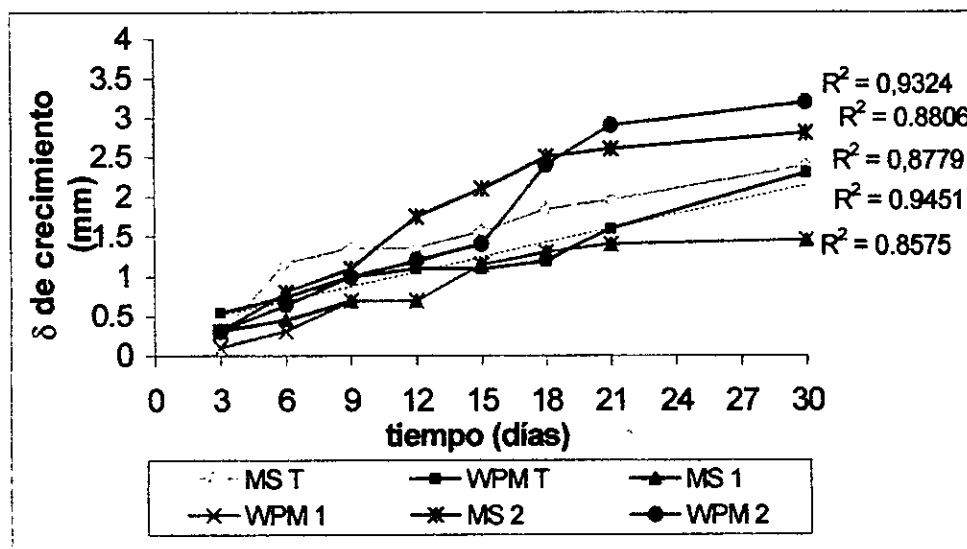
Medio	Tamaño promedio después de 30 idas	δ de crecimiento	Oxidación
WP T 100 mgL ⁻¹ de ac. ascórbico	4.2	2.3	++++
WP 1 200 mgL ⁻¹ de ac. Ascórbico y 150 mgL ⁻¹ de ac. cítrico	3.35	1.45	+++++
WP 2 300 mgL ⁻¹ de ac. ascórbico	5.2	3.2	+++

Medio	Tamaño promedio después de 30 idas	δ de crecimiento	Oxidación
MS T 100 mgL ⁻¹ de ac. ascórbico	4.77	2.39	+++
MS 1 200 mgL ⁻¹ de ac. Ascórbico y 150 mgL ⁻¹ de ac. cítrico	3.45	1.55	+++++
MS 2 300 mgL ⁻¹ de ac. ascórbico	5.3	2.8	+++

Oxidación: +++ = oxidación media del explante completo.

++++ = oxidación fuerte en base y cuerpo del explante, incluye hojas.

+++++ = exceso de oxidación, el explante está casi muerto.



GRÁFICA 4.3. Incremento en el crecimiento de los brotes cultivados en medios con distintos antioxidantes y variando su concentración (Ver tipo y conc. en tabla 4.3).

Como podemos ver en la gráfica 4.3 no se observa una diferencia significativa en cuanto al crecimiento, entre los medios de cultivo que llevaron el mismo tratamiento, por ejemplo comparar MS1 con WPM 1. Sin embargo, si se observan diferencias marcadas entre las diferentes concentraciones de antioxidante utilizadas. El tratamiento donde se utilizaron 300 mgL^{-1} de ácido ascórbico fue el que mostró mejores resultados tanto para el medio MS como para el WPM en cuanto a crecimiento y oxidación (Ver gráfica 4.3 y tabla 4.3). Este antioxidante es el de mayor uso en cultivo de tejidos pues ha mostrado alta efectividad como antioxidante, supresor de formación de callo e incluso se ha estudiado su efectividad como inductor para la formación de brotes adventicios. Aunque aún no se conoce su mecanismo de acción, se cree que al descomponerse a ascorbato, ofrece cierta protección al tejido de sustancias endógenas como podrían ser fitohormonas y fenoles (21).

Los medios donde se observaron los resultados más pobres fueron aquellos que estaban suplementados con ácido ascórbico y ácido cítrico, ya que en estos medios además de observarse un crecimiento muy pobre se observó oxidación del tejido a los 7 días de cultivo lo cual no se encontró en los demás medios. Esto probablemente muestra que el ácido cítrico a pesar de tener características químicas similares a las del ácido ascórbico, no tiene una actividad antioxidante tan efectiva como el ácido ascórbico en este sistema.

Estos resultados indican que el crecimiento de los brotes depende en gran magnitud de la presencia de un antioxidante específico a una

concentración adecuada. Esto se debe a que al iniciarse la oxidación de un explante, su crecimiento se ve truncado pues la planta empieza a morir antes de alcanzar su tamaño máximo.

4.3.2. Ensayo B. Ácido ascórbico vs pirogalol.

Debido a que los resultados anteriores mostraron que en presencia de ácido ascórbico y/o cítrico había oxidación de los explantes, se decidió utilizar distintos antioxidantes y diferentes concentraciones de los mismos para encontrar aquel que promueva la mejor respuesta de crecimiento y brotación múltiple.

El ácido ascórbico es una de las sustancias más utilizadas en el cultivo de tejidos pues es considerado un buen antioxidante, ya que protege a las células vivas contra la acción destructiva de los agentes oxidantes que se forman a partir del oxígeno. Algunas de las sustancias que pueden ser perjudiciales para los tejidos son: el peróxido de hidrógeno, los iones superóxido o cualquier metabolito secundario que en presencia de oxígeno reaccione formando una entidad tóxica para las células vegetales (3,4).

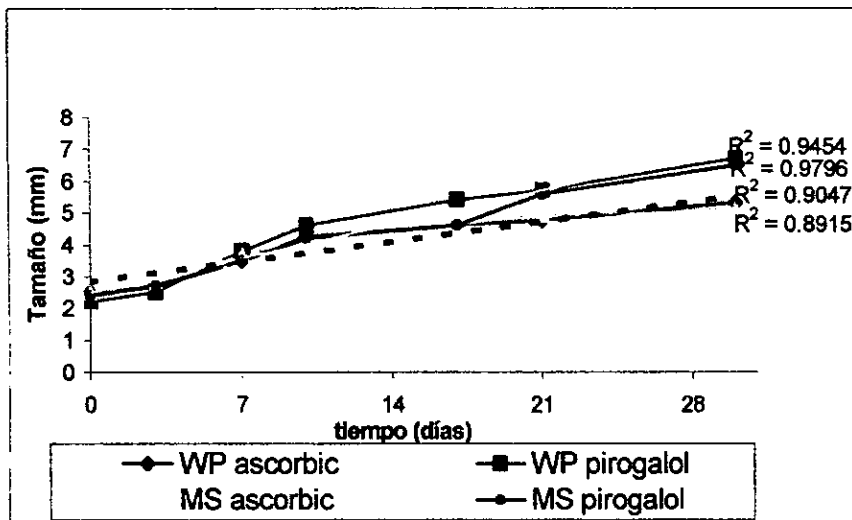
El pirogalol es un polifenol que se ha obtenido de diversas especies como *Alium* y *Sequoia* y se utiliza en ensayos bioquímicos para evidenciar la presencia del radical superóxido. Los polifenoles son sustancias que poseen un anillo aromático con sustituyentes de grupo hidroxilo. Estos sustituyentes son los que le proporcionan su reactividad (5).

En este ensayo, se compararon los medios MS y WPM suplementados con sus vitaminas correspondientes y con los reguladores de crecimiento utilizados anteriormente (Tabla 4.4).

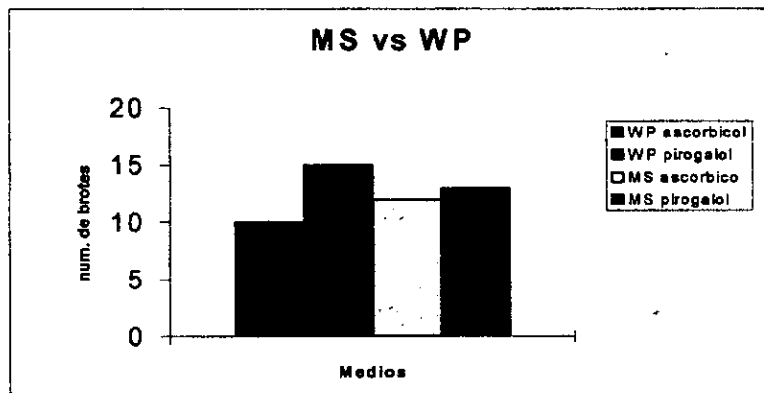
Tabla 4.4 Crecimiento promedio y brotación de yemas cultivadas en medios de cultivo utilizando ácido ascórbico y pirogalol como antioxidantes.

Medio	Numero de brotes sembrados	Tamaño (mm.)	Oxidación
MS a 300 mgL ⁻¹ ácido ascórbico	10	5.1	++++
MS p 12.5 mgL ⁻¹ pirogalol	10	6.5	++
WP a 300 mgL ⁻¹ ácido ascórbico	10	5.25	+++++
WP p 12.5 mgL ⁻¹ pirogalol	10	6.5	++++

Oxidación: += Poca oxidación que se observa generalmente en la base.
 +++= oxidación fuerte que se observa en base y cuerpo del brote incluyendo las hojas.
 ++++=exceso de oxidación, explante casi muerto.



GRÁFICA 4.4. Incremento promedio total del tamaño de las yemas cultivadas en los distintos medios utilizados.



GRÁFICA 4.5. Número de brotes diferenciados en la base de la yema después de 30 días.

Los resultados del tratamiento con pirogalol o ácido ascórbico muestran una mayor eficiencia del primero sobre el ácido ascórbico como agente antioxidante (Ver tabla 4.4). En este ensayo se realizó un subcultivo a los 15 días debido a que la oxidación produjo la muerte de los tejidos y se decidió duplicar la concentración de pirogalol a 25 mgL^{-1} observándose una mejoría inmediata en las condiciones de los explantes mantenidos en medios con este antioxidante. El grado de oxidación de los tejidos después de 30 días en medios suplementados con pirogalol, presentaron una oxidación mucho menor que los que se sembraron en medios que contenían ácido ascórbico.

Así mismo, en cuanto al tamaño de los brotes, se observa una ligera superioridad de los medios con pirogalol sobre aquellos con ácido ascórbico (1.24 veces más eficiente el medio con pirogalol que aquél con ácido ascórbico). En cuanto a la inducción de brotes adventicios, únicamente la comparación entre los medios WP con ambos tratamientos, muestra una mejor respuesta del que contiene pirogalol sobre el tratamiento con ácido ascórbico, mientras que en los medios MS con ambos tratamientos la diferencia es mínima.

La variación de respuesta entre los dos medios MS y WP tampoco fue muy evidente, pues se observó una tendencia similar en cuanto al tamaño promedio final y al número de brotes que se indujeron. Esta tendencia es probable que se deba a que los medios MS y WPM son muy similares en cuanto a composición química. La diferencia principal entre estos medios es que el medio MS contiene KI y CoCl_2 , además de una mayor concentración de nitratos y amonio. El yodo no es considerado un elemento esencial para la nutrición de las plantas, sin embargo se ha reportado su efectividad para la inducción de raíces y para

la prevención de oxidación en el cultivo de tejidos de palma de coco (7). El cobalto es uno de los componentes principales de los análogos de la vitamina B₁₂, involucrados en la síntesis de ácidos nucleicos. A su vez, es un elemento que reduce la producción de etileno, compuesto que en exceso puede ser tóxico para las plantas y puede inhibir su crecimiento (6,9).

Es posible que la presencia de estos elementos en el medio MS haya conferido a los explantes, una mayor resistencia a la oxidación.

Por lo anterior, se decidió para el siguiente experimento utilizar únicamente el medio MS que, aunque no presentó la mayor inducción de brotes adventicios, mostró un menor grado de oxidación para los tejidos.

Probablemente, el medio WP con pirogalol mostró una mayor eficiencia en la inducción de brotes adventicios por tener una menor fuerza iónica, que el medio MS lo que le permitió aprovechar de mejor forma los nutrientes y hormonas presentes en el medio. Sin embargo, esta característica puede resultar perjudicial si los fenoles y compuestos oxidados son reabsorbidos por las plantuías.

4.3.3 Ensayo C. Efecto antioxidante de varias concentraciones de pirogalol y carbón activado.

Debido a la eficacia que mostró el pirogalol como antioxidante, se decidió evaluar la respuesta de los explantes ante distintas concentraciones del mismo. En el experimento anterior, al realizar un subcultivo se dobló la concentración de pirogalol mejorando la respuesta de los tejidos ante la oxidación. Por lo

tanto se decidió tomar esa concentración como la concentración basal para el siguiente ensayo.

Así mismo, se implementó un medio que además de pirogalol contuvo carbón activado, esperando que la actividad antioxidante y adsorbente de este último mejorara las condiciones de protección contra la oxidación de las plantas.

Los resultados de los tratamientos se muestran en la tabla 4.5 y en la gráfica 4.6:

Tabla 4.5. No. total de brotes diferenciados, tamaño y oxidación de los brotes de Ceiba sembrados en medios con distintas concentraciones de pirogalol y carbón activado.

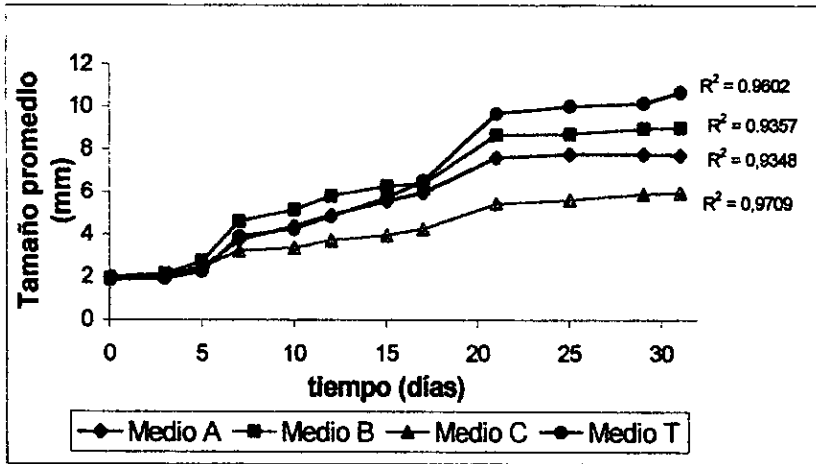
Medio	No brotes promedio por explante	Tamaño después de 31 días	Oxidación a partir del día 10
MS A 19 mgL ⁻¹ pirogalol	1.35	7.75	++++
MS B 31 mgL ⁻¹ pirogalol	1.7	9	+++
MS C 25 mgL ⁻¹ pirogalol y 5 g. carbón activado	1.2	5.94	++
MS T 25 mgL ⁻¹ pirogalol	1.5	10.66	+++

Oxidación:++= Poca oxidación , se observa únicamente en la base.

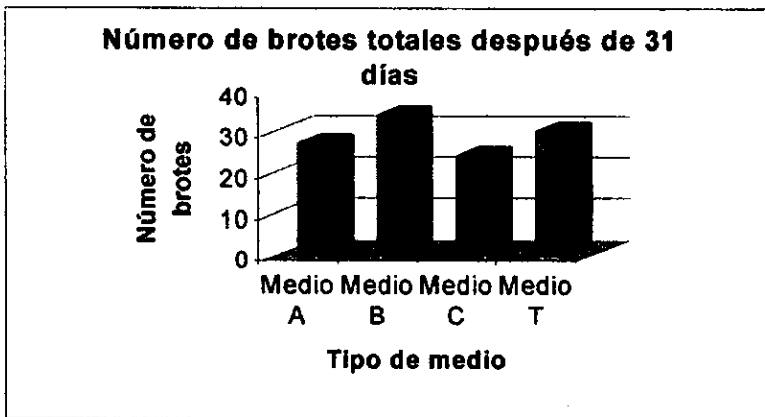
+++= oxidación moderada , se observa en la base y algunas zonas del explante.

++++= oxidación fuerte, se observa en base y cuerpo del brote incluyendo las hojas.

+++++=exceso de oxidación, explante casi muerto.



GRÁFICA 4.6. Tamaño promedio de los explantes después de 30 días cultivados en el medio MS con distintas concentraciones de pirogalol y carbón activado (Ver composición del medio en la tabla 4.5).



GRÁFICA 4.7. Número de brotes diferenciados después de 30 días en los medios suplementados con distintas concentraciones de pirogalol .

Como podemos ver en las gráficas 4.6 y 4.7 y en la tabla 4.5, la concentración de pirogalol afecta directamente al explante en cuando a su crecimiento y a la inducción de brotes adventicios.

Los brotes que se encontraban en el medio T (25 mgL^{-1}) y el medio B (31 mgL^{-1}) tuvieron una oxidación escasa durante los primeros 15 días de cultivo. Al día 17, se observó oxidación en las zonas del tejido donde había formación de callo, por lo que se decidió realizar un subcultivo procurando eliminar la mayor cantidad de éste último y pasando los explantes por una solución de ácido ascórbico. La respuesta fue inmediata y se observó mejoría en la condición de los explantes. A los 31 días se observó la presencia de raíces en 4 brotes del medio T y en 2 brotes del medio B. (Ver ilustración 4.1)

Los brotes en el medio suplementado con carbón activado mostraron la menor oxidación de los cuatro medios utilizados. Sin embargo, el crecimiento de los explante fue muy lento y la inducción de brotes adventicios fue muy pobre. El carbón activado es un fuerte adsorbente, que se une a exudados fenólicos, así como a citokinas residuales. El medio de cultivo utilizado contiene citokinas como reguladores de crecimiento, y es posible que se haya formado un enlace entre estas sustancias y el carbón activado, lo que afectó su aprovechamiento por los brotes cultivados. Así mismo, se ha reportado que si el carbón activado es agregado antes de la esterilización en autoclave, provoca la disminución del pH del medio(9,6). La disminución de pH puede inducir la precipitación de algunas sales en el medio, además de afectar la actividad de algunas enzimas lo que podría provocar una reducción en la vitalidad de los explantes. Así mismo, el medio posee un potencial osmótico alto por tener además de las sales inorgánicas, partículas de carbón activado podría aumentar la cantidad de solutos en el medio. Esta característica puede provocar un

estrés en las células ocasionando una disminución en la rapidez de crecimiento de las mismas.

Los resultados obtenidos con pirogalol provocaron un bajo índice de oxidación de los explantes. Incluso, se presentó un fenómeno que no se esperaba, que fue la inducción de raíz. Los medios con una mayor concentración de pirogalol fueron los que presentaron explantes con raíces, las cuales aparecieron pocos días después del subcultivo. Es posible que el estrés al que se someten los explantes debido al subcultivo y la concentración de sales inorgánicas y pirogalol en el medio de cultivo provoquen la formación de raíces.

La eficiencia del pirogalol como antioxidante en el cultivo in vitro de la Ceiba, se debe a su capacidad para formar complejos con proteínas. La Ceiba secreta un mucopéptido que reacciona con el aire, oxidándose inmediatamente. Al realizar la siembra de los explantes, la sustancia secretada por los explantes provocaba que incluso antes de ser inoculadas al medio de cultivo, los explantes tomaran una coloración café clara.

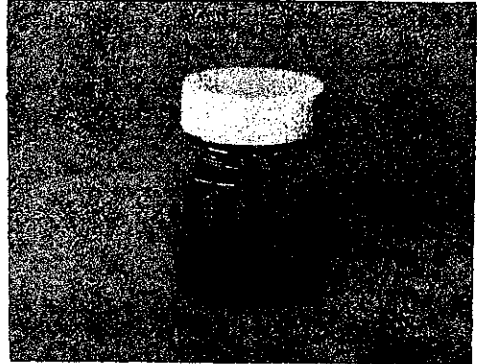
Al estar presente en el medio de cultivo el pirogalol era muy probable que se formaran complejos con el mucopéptido, evitando así que continuara su oxidación y que afectara al tejido.

Así mismo, al utilizar una concentración pequeña de pirogalol, no se afecta el potencial osmótico del medio de cultivo ni su fuerza iónica, promoviendo el aprovechamiento máximo de todos los nutrientes y la inducción de brotes adventicios.

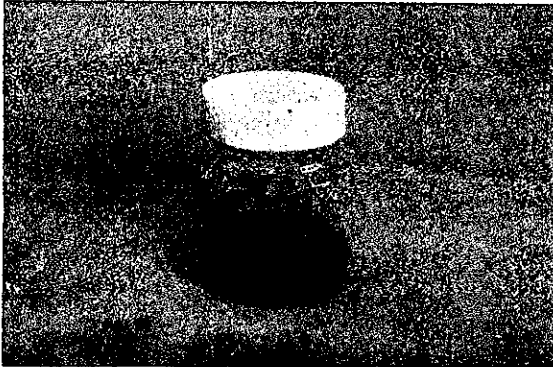
ILUSTRACIÓN 4.1



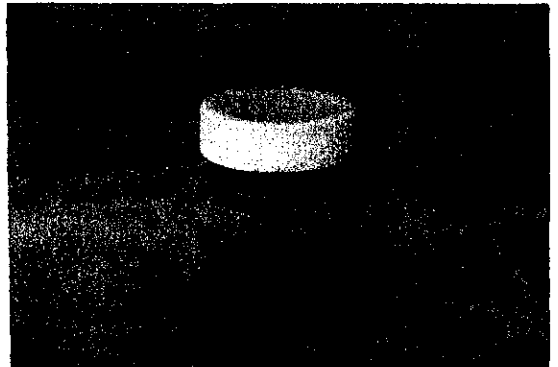
Planta madre



**Ceiba pentandra en
medio MS T
Presencia de raíz**



**Presencia de brotes múltiples
de Ceiba pentandra medio MS B**



**Yema de Ceiba
pentandra en medio MS T**

4.4. PROTOCOLO PROPUESTO PARA LA INDUCCIÓN DE BROTAÇÃO Y CRECIMIENTO IN VITRO DE CIEBA PENTANDRA.

Las condiciones óptimas para el cultivo *in vitro* de yemas de *Ceiba* según los resultados anteriormente descritos serían las siguientes:

DESINFECCIÓN

Lavar los explantes con detergente comercial.



En la campana de flujo laminar sumergir en una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador comercial) al 10% y Microdín 3 ml L⁻¹ durante 10 minutos.

Enjuagar tres veces con agua desionizada estéril.



SIEMBRA

Obtener la yema removiendo hojas laterales y bráctea.



CULTIVO IN VITRO

Sembrar en medio de cultivo básico MS suplementado con glicina, vitaminas R-2 y como antioxidante pirogalol a una concentración de 25 mgL⁻¹. Se adicionan como fitoreguladores BAP a una concentración de 0.144 mgL⁻¹ y 2ip a una concentración de 0.036 mgL⁻¹ para lograr la inducción de brotes adventicios y el crecimiento de los brotes cultivados.



Subcultivo a los 21 días ,pasando los brotes por una solución de ácido ascórbico antes de sembrar. Esto puede inducir la formación de raíz.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- Para lograr la desinfección de los explantes de Ceiba para su cultivo *in vitro* es conveniente utilizar hipoclorito de sodio AL 10 %y Microdín 3 ml L⁻¹. La utilización de un surfactante fuerte afecta las condiciones del tejido.
- Se encontró que el medio de cultivo adecuado para la micropropagación de la Ceiba es el medio MS debido a que contiene además de nitratos, una fuente de nitrógeno reducido, así como una fuente de molibdeno.
- Los reguladores de crecimiento que mostraron una mejor respuesta en la inducción de brotes adventicios y crecimiento de Ceiba fueron el BAP a una concentración de 0.144 mgL⁻¹ y el 2ip a una concentración de 0.036 mgL⁻¹.
- Uno de los componentes principales del medio de cultivo para la micropropagación de la Ceiba es el antioxidante, siendo el pirogalol, a una concentración de 25 mgL⁻¹ el que mostró la mejor respuesta para el crecimiento e inducción de brotación en Ceiba.
- El subcultivo de los explantes a los 21 días, en las condiciones apropiadas induce la formación de raíces, para obtener así de un propágulo, una planta completa.

- En el presente trabajo, se delinearon los pasos generales para la propagación y mantenimiento *in vitro* de esta especie concentrando los esfuerzos en erradicar la oxidación, que es el principal problema para la micropropagación de especies forestales. Ya con el camino trazado, la línea de investigación para lograr la propagación masiva de esta especie de importancia ecológica, económica e incluso con posibles usos en el ramo farmacéutico, queda abierta y con amplias posibilidades para que sea continuada y mejorada a un corto plazo.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES PARA EL DESARROLLO DEL PROTOCOLO PARA EL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE *CEIBA* *PENTANDRA*.

- La elaboración de un protocolo para la propagación in vitro de la Ceiba, requiere un estudio complejo y elaborado que requiere de la participación de químicos, biólogos y agrónomos para delucidar las distintas variables que afectan o benefician el crecimiento óptimo y la propagación masiva de la especie en estudio.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

1. Abercrombie, M., Hickman, C.J. and Johnson, M.L., A dictionary of Biology, 5ta edición, Ed. Penguin Books, Great Britain, 1968.
2. Bhojwani S.S., Razdan M.K., Plant Tissue Culture: Theory and Practice, Elsevier Science Publishers, N.Y., USA, 1983.
3. Bohinsky R., Bioquímica, 5ta edición, Editorial Addison Wesley Iberoamericana, México D.F., 1991.
4. Bonga J.M., Von Aderkas P., In Vitro Culture of Trees, en Forestry Sciences, Kluwer Academic Publishers, Vol.38, USA, 1992.
5. Dey P.M., y Harborne J.B., Methods in Plant Biochemistry, Plant phenolics, Vol. 1, Academic Press, London, 1989.
6. Endress, R., Plant Cell Biotechnology, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 1994.
7. Euwens, J., Media development and influence of inorganic compounds in palm cultures, Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue Culture, Tokyo Japan, Edited by Akio Fujiwara, 1962.
8. Flinn, B.S., *In vitro* control of caulogenesis by growth regulators and media components in embryonic explants of eastern white pine, Can J Bot 64: 1948-1948-1956, 1986.
9. George E.F. & Sherrington P.D., Plant Propagation by Tissue Culture: Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics Ltd., Edington 1988.
10. Hartmann H.T., Kester D.E., Propagación de Plantas: Principios y Prácticas, Ed. Prentice Hall, México, D.F., 1987.

11. Haslam E., *Chemistry and Pharmacology of Natural Products, Plant Polyphenols vegetable tannins revisited.*, Cambridge University Press, G.B.,1989.
12. Heywood V.H., "Efforts to conserve tropical plants-A global perspective" en *Conservatio of Plant Genes*, Academic Press, USA, 1992.
13. Holdrige, L.R., *Árboles de Puerto Rico*, Puerto Rico, 1967.
14. Hu C.y., Wang P.J., *Meristem, Shoot tip and Bud cultures*, en *Handbook of Plant tissue culture*, Ed. McMillan, Vol. 1, U.S.A., 1986.
15. Hurtado D., Merino M.E., *Cultivo de tejidos vegetales*, Ed. Trillas, México, D.F., 1988.
16. Lehninger A., *Bioquímica, Las bases moleculares de la estructura y función celular*, Ed. Omega, Barcelona, España, 1982.
17. Murashige, T. Y Skoog, F. "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures", *Physiol. Plant*, 15: 473-497, 1962.
18. Niembro A., *Árboles y arbustos útiles de México*, Ed. Limusa Noriega, México D.F., 1990.
19. Pennington y Sarukhan J. , *Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México*, Instituto de Investigaciones forestales, México, D.F., 1968.
20. Pierik, R.L.M, *Cultivo in vitro de las plantas superiores*, Ed. Mundi-Prensa, España, 1988.
21. Sharma, Neelam & Chandel, K.P.S., *Effects of ascorbic acid on axillary shoot inductio in Tylophora indica (Burm. F.) Merrill.* , *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 29: 109-113, 1992.

22. Smith, G.C., y Dueker S.R., Carotenoid values of selected plant foods common to southern Burkina Faso, West Africa, *Ecology of Food and Nutrition*, 35: 1, 43-58, 1996.
23. Standley, P.C., *Trees and Shrubs of Mexico*, Washington Gov. Print off, Smithsonian Institution, USA, 1961.
24. Rao, A.N., y Lee S.K., Importance of Tissue Culture in Tree Propagation, *Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue Culture*, Tokyo Japan, Edited by Akio Fujiwara, 1962.
25. Robert M.L., Loyola V.M., *El Cultivo de Tejidos vegetales en México*, Centro de Investigación científica de Yucatán, CONACYT, México D.F., 1985.
26. Rumary C., Thorpe, Plantlet formation in black and white spruce, en *In vitro techniques*. *Can J For Res* 14:10-16. 1984.
27. Williams RR, Taji, A.M. Bolton, J.A., Specificity and interaction among auxins, light and pH in rooting of Australian woody species in vitro, *Hort. Sci.*, 20:1052-1053.
28. Vidale H., *Cultivo in vitro*, Ed. Científica, México D.F., 1986.
29. Villegas, A., Rodriguez Jorge, Efecto de Benciladenina, Ácido Indolacético, niveles de agar y carbón activado en la micropropagación de piña., *Agrociencia, serie Fitociencia* Vol. 2 2: 125-135, 1991.
30. Vintehalter D. & Vinterhalter B., Effect of inorganic nutrition on de formation of lateral roots in *Dracaena fragans* Ker-Gawl cultured in vitro, *Plant Cell Tiss. Org. Cul.*, 28: 267-274, 1992.

APÉNDICE

Medio MS (Murashige & Skoog, 1962)

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK 100X mM.l ⁻¹
		mg.l ⁻¹	mM.l ⁻¹	
Solución I				
NH ₄ NO ₃	80.040	1650	20.6	2060
KNO ₃	101.108	1900	18.8	1880

Solución II				
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246.480	370.0	1.5	150
MnSO ₄ · H ₂ O	169.010	16.9	1 × 10 ⁻²	1
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287.540	8.6	3 × 10 ⁻²	3
CuSO ₄ · 5H ₂ O	249.680	2.5 × 10 ⁻²	1 × 10 ⁻²	1 × 10 ⁻²

Solución III				
CaCl ₂ · 2H ₂ O	147.020	440.00	3.0	300
KI	166.010	0.83	5 × 10 ⁻³	5 × 10 ⁻¹
CoCl ₂	237.930	2.5 × 10 ⁻²	1 × 10 ⁻⁴	1 × 10 ⁻²

Solución IV				
KH ₂ PO ₄	136.090	170.00	1.25	125
H ₃ BO ₃	61.860	6.20	1 × 10 ⁻¹	10
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241.950	2.5 × 10 ⁻¹	1 × 10 ⁻³	1 × 10 ⁻¹

Solución V				
FeSO ₄ · 7H ₂ O	278.028	27.80	1 × 10 ⁻¹	10
EDTA · 2H ₂ O	372.028	37.30	1 × 10 ⁻¹	10

Fuente de carbono				
Sacarosa	342.310	30.00	87.63	

Medio WPM (Lloyd & McCown 1981)

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK 100 mM.l ⁻¹
		mg.l ⁻¹	mM.l ⁻¹	
Solución I				
NH ₄ NO ₃	80.040	400	4.99	499
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	190.08	556	2.92	292

Solución II				
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.48	370	1.5	150
MnSO ₄ * H ₂ O	169.01	22.3	1.3x10 ⁻¹	13.19
ZnSO ₄ *7H ₂ O	287.54	8.6	3x10 ⁻¹	30
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	249.68	2.5x10 ⁻¹	1x10 ⁻³	1x10 ⁻¹

Solución III				
CaCl ₂ *2H ₂ O	147.08	96	0.652	65.2

Solución IV				
KH ₂ PO ₄	136.09	170	1.25	125
H ₃ BO ₃	61.86	6.2	7x10 ⁻³	7x10 ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241.95	2.5x10 ⁻¹	1x10 ⁻³	1x10 ⁻¹

Solución V				
FeSO ₄ ·7H ₂ O	278.028	27.80	1x10 ⁻¹	10
Na ₂ EDTA ·2H ₂ O	372.028	37.30	1x10 ⁻¹	10

Fuente de carbono				
Sacarosa	342.310	30.00	87.63	

Medio Heller (1953).

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK 100 mM.l ⁻¹
		mg.l ⁻¹	mM.l ⁻¹	
Solución I				
NaNO ₃	85	600	7.05	705

Solución II				
MgSO ₄	246.480	250	1.014	101.42
MnSO ₄ ·H ₂ O	169.010	7.6 × 10 ⁻²	4.5 × 10 ⁻⁴	4.5 × 10 ⁻²
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.540	1	3.47 × 10 ⁻³	3.4 × 10 ⁻¹
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.680	3 × 10 ⁻²	1.2 × 10 ⁻⁴	1.2 × 10 ⁻²

Solución III				
KCl	74.56	750	10.06	1006
CoCl ₂	237.930	4.7 × 10 ⁻²	1.97 × 10 ⁻⁴	1.97 × 10 ⁻⁴
MgCl ₂	95.22	2.1 × 10 ⁻²	2.2 × 10 ⁻⁴	2.2 × 10 ⁻²
KI	166.010	1 × 10 ⁻²	6.02 × 10 ⁻⁵	6.02 × 10 ⁻³

Solución IV				
H ₃ PO ₄	61.86	1	1.6 × 10 ⁻²	1.6
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	137.99	125	0.905	90.58

Solución V				
FeCl ₂ ·6H ₂ O	243.85	1	4.1 × 10 ⁻³	4.1 × 10 ⁻¹

Fuente de carbono				
Sacarosa	342.310	30.00	87.63	

VITAMINAS R-2 (1962)

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK 100 mM.l ⁻¹
		mg.l ⁻¹	mM.l ⁻¹	
Mio-inositol	180.16	100	0.55	55.5
Tiamina	327.36	0.1	3.05×10^{-4}	3.05×10^{-2}
Acido nicotínico	123.11	0.5	4.06×10^{-3}	0.406
Piridoxina- HCl	205.64	0.5	2.43×10^{-3}	0.243

VITAMINAS WPM (1981)

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK 100 mM.l ⁻¹
		mg.l ⁻¹	mM.l ⁻¹	
Mio-inositol	180.16	100	0.55	55.5
Tiamina	327.36	1.0	3.05×10^{-3}	3.05×10^{-1}
Acido nicotínico	123.11	0.5	4.06×10^{-3}	0.406
Piridoxina- HCl	205.64	0.5	2.43×10^{-3}	0.243

PREPARACIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO:

BAP	10 mg/100 ml disolver en 2 gotas de HCl 1 N
2ip	10 mg/100 ml disolver con 2 gotas HCl 1 N.
AG ₃	10 mg/100 ml disolver en agua tibia.
AIB	10 mg/100 ml diolver en 2 gotas NaOH 1 N

ESTA TESIS NO DEBE
SIR DE LA BIBLIOTECA