

70



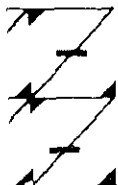
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

Estudios de cultivo "in vitro" de
Beschorneria yuccoides C. Koch.

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO - BIOLOGO
P R E S E N T A .
TORRES MARTINEZ MARIA DEL CARMEN

N A M
E S
AGOZA



MANO FIJE
CON REFLEXION

2001

ABRIL 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIAS

A Dios:

Por haberme permitido, concluir uno de mis más grandes anhelos en la vida, por estar siempre a mi lado y por ser la razón de vida.

A mis padres:

Pablo y Eloisa

Por guiar cada uno de mis pasos, con cariño y amor, por tener fe en mí y porque gracias a su apoyo y consejo he llegado a realizar la más grande de mis metas, la cual constituye la herencia más valiosas que pudiera recibir.

A mis hermanos:

Juan Pablo, Marcos y Rosalinda

Por su cariño, apoyo y por los momentos felices y difíciles que compartimos.

A mis sobrinos:

Gema y Eduardo

Los pequeños seres que llegaron a iluminar nuestras vidas.

A mis abuelitos:

Felix y Consuelo

Por ser ejemplos de dedicación, esfuerzo y lucha, por su cariño y comprensión, que siempre fue aliciente para seguir adelante.

A una persona muy especial:

Por su ejemplo, enseñanzas, consejos y por alentarme a seguir siempre adelante.

A la memoria del Señor *Hermilo Leal Carrera'*,
quien a pesar de no estar presente hoy,
siempre ha estado y estará su recuerdo en mí.

A mi amigo: Pablo Basilio Espeítes

Por su cariño, comprensión y motivación.

Persona con la que compartí momentos muy gratos de mi vida de estudiante, que me alienta y cree en mí.

A mis amigos:

De Abbott Laboratories: Edmundo,
Orlando, Jorge, Audelia, Eva, Cecilia,
Virto, Alfredo y Moisés.

Con quienes he compartido buenos y malos momentos a lo largo de nuestra amistad y desarrollo profesional.

A todas las personas y amigos con las que he compartido grandes momentos de mi vida y no he nombrado.

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a la Dra. Thelma L. Villegas Garrido por permitirme llevar a cabo el presente trabajo de investigación en el Lab. de Cultivo de Tejidos Vegetales del Depto. de Biofísica de la ENCB del IPN.

Al M. en C. Gerónimo Peña Clímaco por su dirección, apoyo y confianza durante la elaboración de experimentos y revisión del trabajo.

A la Biol. Lilia Rico por compartir sus experiencias en este ámbito, por sus aportaciones y enseñanzas para la elaboración del presente trabajo.

A mis Sinodales por las aportaciones hechas a la mejora del trabajo y por el tiempo que dedicaron a la revisión de esta tesis:

Q. Ma. Teresa Mendoza Mata
Q.F.B. Idalia Leticia Flores Gómez
M. en C. Beatriz Espinosa Franco
M. en C. Benito Reyes Trejo

A todas las personas y compañeros de laboratorio de CTV por sus enseñanzas, sugerencias y consejos para la realización del presente trabajo.

ÍNDICE

	PÁG.
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Biotecnología Vegetal	3
1.1.1 Propagación de plantas	6
1.1.1.1 Respuesta morfogénica	9
1.1.2 Obtención de sustancias con aplicación industrial	12
1.1.3 Transformación de plantas	16
1.2 Plantas con propiedades antifúngicas	17
1.3 Generalidades del Género <i>Beschorneria</i>	18
1.3.1 Descripción botánica	20
1.3.2 Distribución	21
1.3.3 Usos	22
1.3.4 Fitoquímica	23
1.3. Estudios etnobotánicos, microbiológicos y edafológicos de <i>B. yuccoides</i> C. Koch	24
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
3. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo general	29
2.2 Objetivos particulares	29

	PÁG.
HIPÓTESIS	30
METODOLOGÍA	31
5.1 Material, reactivos y equipo	31
5.2 Material biológico y selección de explantes	32
5.3 Obtención de material biológico en condiciones asépticas	32
5.4 Evaluación del porcentaje de contaminación	35
5.5 Medios de cultivo y reguladores de crecimiento	36
5.6 Evaluación del tipo de respuesta	38
5.7 Control de la oxidación	39
5.8 Condiciones de incubación	40
RESULTADOS Y DISCUSION	42
6.1 Selección de explantes	42
6.2 Métodos de desinfestación	43
6.3 Reguladores de crecimiento y respuesta morfogénica	46
6.4 Control de la oxidación	50
6.5 Condiciones de incubación	51
CONCLUSIONES	52
PROPUESTAS	53
REFERENCIAS	54
NEXO I	58
NEXO II	59

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁG
FIGURA 1	ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO.	8
FIGURA 2	FOTOGRAFÍA DE <i>Beschorneria yuccoides</i> C. Koch CON INFLORESCENCIA.	20
FIGURA 3	FRUTO MADURO DE <i>Beschorneria yuccoides</i> C Koch	21
FIGURA 4	PORCENTAJE DE CRECIMIENTO MICROBIANO CORRESPONDIENTE A LOS DOS PRIMEROS MÉTODOS DE DESINFESTACIÓN, DONDE SE VARIA LA CONCENTRACIÓN Y EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN DEL HIPOCLORITO DE SODIO E HIPOCLORITO DE CALCIO CON EL MATERIAL BIOLÓGICO.	44
FIGURA 5	REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA EFECTIVIDAD DE LA MEZCLA DE ANTIBIÓTICO -FUNGICIDA PARA CONTROLAR LA CONTAMINACIÓN SISTÉMICA DE LA PLANTA	45
FIGURA 6	RESPUESTA MORFOGÉNÉTICA DE TALLO HACIA LA FORMACIÓN DE CALLO CON DIFERENTES REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA CONOCER LA MEJOR RELACIÓN DE AUXINA/CITOCININA.	48

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁG
TABLA I	APLICACIONES ACTUALES Y FUTURAS DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.	6
TABLA II	REGULADORES DE CRECIMIENTO MÁS UTILIZADOS EN CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.	7
TABLA III	FÁRMACOS OBTENIDOS POR CULTIVO DE CÉLULAS DE PLANTAS SUPERIORES.	13
TABLA IV	ALGUNAS PLANTAS CON PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS Y SUS SUBSTANCIAS AISLADAS, DESCRITAS DESDE 1982-1993.	17
TABLA V	CLASIFICACIÓN BOTÁNICA	19
TABLA VI	USOS TRADICIONALES DE <i>Beschorneria yuccoides</i>	22
TABLA VII	METABOLITOS AISLADOS DEL GÉNERO <i>Beschorneria</i> .	23
TABLA VIII	RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE EXTRACTOS CRUDOS DE <i>Beschorneria yuccoides</i> .	25
TABLA IX	MÉTODOS DE DESINFESTACION DE TALLO Y HOJA DE <i>B. yuccoides</i> .	33
TABLA X	MEZCLA DE ANTIBIÓTICO Y FUNGICIDA UTILIZADAS COMO PRE-TRATAMIENTO DE DESINFESTACION DE <i>B. yuccoides</i> .	33
TABLA XI	TRATAMIENTOS DE DESINFESTACION-OXIDACION PROPUESTOS PARA TALLO Y HOJA DE <i>B. yuccoides</i>	34
TABLA XII	TRATAMIENTO DE DESINFESTACIÓN-OXIDACION PROPUESTOS PARA TALLO Y HOJA DE <i>B. yuccoides</i>	34

		PÁG
ABLA XIII	TRATAMIENTOS DE DESINFESTACIÓN-OXIDACIÓN PROPUESTOS PARA TALLO Y HOJAS DE <i>B. yuccoides</i> .	35
ABLA XIV	DISEÑO EXPERIMENTAL CON DIFERENTES REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA CONOCER LA RELACIÓN DE AUXINA/CITOCININA.	36
ABLA XV	DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA RELACIÓN AUXINA/CITOCININA QUE INDUZCA UNA RESPUESTA MORFOGENÉTICA.	37
ABLA XVI	RESPUESTA MORFOGENÉTICA DE DIFERENTES EXPLANTES SEMBRADOS.	42
ABLA XVII	RESPUESTA MORFOGENÉTICA A LA FORMACIÓN DE CALLO CON DIFERENTES REGULADORES DE CRECIMIENTO	47
ABLA XVIII	RESPUESTA MORFOGENÉTICA A LA FORMACIÓN DE CALLO UNA VEZ CONOCIDA LA RELACIÓN DE AUXINA/CITOCININA.	49

ABREVIATURAS

CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
RC	Reguladores de Crecimiento
ANA	Ácido Naftalén Acético
AIB	Ácido indol-3-Butírico
AIA	Ácido indol-3-Acético
2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
6-BAP	6-Bencil amino purina
K	Cinetina
msnm	Metros sobre nivel del mar
ENCB	Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria

RESUMEN

Desde sus inicios el desarrollo cultural de la humanidad ha estado ligado al uso y conocimiento de las plantas. En la lucha diaria por su supervivencia las primeras unidades aprendieron a distinguir frutos, follajes, semillas y raíces de plantas comestibles de aquellas, que no le aportaban ningún beneficio o incluso le resultaban perjudiciales. El hallazgo más importante para los primeros hombres, sin duda el surgimiento de la agricultura, donde se dio inicio; al conocimiento del ciclo de vida de las plantas y un proceso de selección de especies; que hoy constituyen, uno de los más grandes acervos de la humanidad.

En nuestro país se han realizado estudios con plantas usadas en la medicina tradicional en el intento de curar diversos padecimientos. De estudios fitoquímicos, donde se registra el uso de plantas, a partir de las cuales se obtienen extractos jabonosos, utilizadas para combatir infecciones dérmicas producidas por hongos; se encuentra la *Beschorneria yuccoides* C. Koch. Planta valiosa económicamente para al menos; en algunas poblaciones indígenas, por la variedad de usos que presenta como: alimento, jabón natural y planta medicinal.

Hasta ahora, se ha logrado establecer un método biotecnológico, que enfoca el cultivo del Tejido Vegetal, para la propagación y cultivo *in vitro* de *Beschorneria yuccoides*. Que muestra, un control efectivo de la carga microbiana, en los explantes de tallo; con el uso de una mezcla de antibiótico-fungicida, previo tratamiento de desinfección. El inóculo de mejor respuesta morfológica lo es el botón floral (inmaduro) de una inflorescencia, seguido del tallo. Estos explantes responden a la formación de callo y raíz con la relación kinina/citocinina: AIA/K y ANA/6-BAP respectivamente. El botón floral a diferentes concentraciones y el tallo a concentraciones de 10.0 mg/L y 3.0 mg/L. El control de la oxidación se lleva a cabo con la adición de ácido ascórbico a la mezcla de antibiótico-fungicida previo a la siembra, y con la exposición de los explantes en una solución de jugo de limón antes y después de la siembra; mostrando mayor control, éste último. La biotecnología vegetal de esta forma, se convierte en una alternativa más para la preservación y restauración de los recursos naturales, y así mismo la biodiversidad.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos, el hombre ha utilizado a las plantas para satisfacer sus necesidades más apremiantes como son la alimentación y la salud; para ello se ha valido de la selección de especies naturales y/o silvestres. De las plantas de mayor importancia para él, se encuentran aquellas con importantes propiedades medicinales, cuyo conocimiento y empleo se han transmitido de generación en generación constituyendo hasta nuestros días un significativo sostén de la medicina moderna.

Recientemente se han realizado notables hallazgos en países desarrollados referentes a productos naturales de origen vegetal, que se emplean exitosamente en el tratamiento de ciertas enfermedades y de las cuales han hecho patente en las la presencia de sustancias con actividad farmacológica. En nuestro país, se han realizado estudios similares con plantas usadas en la medicina tradicional en intento de curar diversos padecimientos. Tal es el caso de la familia *Agavaceae* en particular el género *Beschorneria*; de la cual la especie más utilizada por comunidades indígenas es *Beschorneria yuccoides* C. Koch conocida comúnmente con el nombre de "amole" o "amolli" por sus propiedades jabonosas en Nahuatl.^{1,2,3,4}

De la familia *Agavaceae* se han aislado entre otros, compuestos esteroidales; encontrándose en forma de saponinas que por hidrólisis, dan origen a sustancias libres de azúcares llamadas sapogeninas, dichas sustancias se consideran terapéuticamente activas, debido a que los extractos de *B. yuccoides* C. Koch han demostrado ser efectivos en el tratamiento de micosis cutánea.^{1,2 y 3.}

La necesidad de encontrar plantas medicinales con propiedades antimicóticas, y la cantidad de compuestos esteroidales presentes en forma de saponinas; que presentan un amplio potencial comercial como metabolito de interés en la industria Farmacéutica, ha llevado a centrar la atención en esta especie. Ya que es una materia prima difícilmente reemplazable en la obtención de hormonas esteroídicas como: anticonceptivos, antiinflamatorios, anabolizantes, etc.⁵

La biotecnología Vegetal forma parte importante de la llamada Tercera Revolución Industrial y que adquiere mayor importancia cuando se aplica a la preservación de los recursos naturales, la biodiversidad, así como en el tratamiento de la contaminación ambiental y en los procesos de biorremediación de los ecosistemas alterados. Ofrece además alternativas diferentes en la producción de sustancias de interés farmacológico; siendo un punto estratégico más, en los materiales económicos que comúnmente ayudan a construir una Industria Farmacéutica en los países del Primer Mundo. ⁶

El objetivo de este trabajo fue establecer un método Biotecnológico para la propagación y cultivo "in vitro" de *B. yuccoides* por Cultivo de Tejidos Vegetales; que consistió en: controlar la contaminación sistémica de la planta con una mezcla de antibiótico-fungicida previo a los tratamientos de desinfección, donde el inóculo de mejor respuesta morfogénica la da, el botón floral (inmaduro) de una inflorescencia, seguido del tallo. Estos explantes responden a la formación de callo y raíz. El botón floral en la relación de auxina/citocinina -AIA/K- a diferentes concentraciones; el tallo a la relación de -ANA/6-BAP- a concentraciones de 10.0 mg/L y 3.0 mg/L. El control de la oxidación se lleva acabo con la adición de ácido ascórbico a la mezcla de antibiótico-fungicida previo a la siembra, y con la exposición de los explantes en una solución de jugo de limón antes y después de la siembra, mostrando mayor control, éste último.

1. ANTECEDENTES

1.1. BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

La Biotecnología se define desde el punto de vista industrial, como el conjunto de tecnologías nuevas y tradicionales que involucran la aplicación de los procesos de los sistemas biológicos y/o las capacidades metabólicas de los seres vivos, en la producción de bienes y servicios que repercuten en una mejoría en la calidad de vida del hombre, en sectores tales como la agricultura, el medio ambiente y las industrias: farmacéutica, de alimentos y química.⁷

La Biotecnología ofrece alternativas interesantes y novedosas para producir alimentos, fármacos, técnicas para la protección y restauración del ambiente. En los últimos 20 años ha tenido un desarrollo impresionante, por lo que no es raro hoy en día ver la aplicación de las tecnologías de punta, tales como el ácido desoxirribonucleico (DNA) recombinante y la fusión celular a procesos biotecnológicos convencionales como: la producción de vinos, cerveza o el mejoramiento de especies vegetales y animales.^{7 y 8}

Es por, eso que se considera que la biotecnología forma parte importante de la llamada Tercera Revolución Industrial, lo que la coloca de manera preponderante dentro de los planes estratégicos de la industria de procesos, en la aplicación de la preservación de los recursos naturales, la biodiversidad, así como en el tratamiento de la contaminación ambiental y en los procesos de biorremediación de los ecosistemas alterados.^{6, 7 y 8}

México, ocupa uno de los primeros lugares a nivel mundial en cuanto a la diversidad de sus recursos naturales, lo que le brinda el calificativo internacional de país con *megabiodiversidad*, hecho que desde el punto de vista de la ingeniería genética, representa bancos de genes indispensables para la nueva y naciente agroindustria basada en los avances biotecnológicos.

Este hecho de gran trascendencia, ha sido considerado dentro del sector académico y científico del país, pero también debe ser analizado y considerado con conocimiento y cuidado dentro del sector empresarial, del gobierno y legislativo del país, en un momento donde la regulación de la propiedad

intelectual y la posibilidad de patentar la vida se halla en el centro del debate a nivel internacional.⁹

Dentro del campo de la biotecnología vegetal, los avances recientes en el conocimiento de genes, así como el funcionamiento bioquímico y fisiológico de las plantas, han abierto áreas relevantes aplicadas a la obtención de variedades vegetales con mayor adaptabilidad a su ambiente, productividad y resistencia a plagas o enfermedades.¹⁰

La biotecnología vegetal es un campo del saber que se encuentra en crecimiento muy dinámico, donde los científicos buscan entender mejor, para manejar tanto los aspectos benéficos como los perjudiciales que afecten la vida de las plantas y su aplicación hacia los procesos productivos de bienes y servicios.¹⁰

En este contexto, el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV), es una herramienta de la biotecnología vegetal; bajo este nombre, se agrupa un amplio conjunto de técnicas que permiten el manejo *in vitro* de células, tejidos y órganos provenientes de plantas, logrando: la propagación masiva de plantas de ornato en peligro de extinción y de importancia ecológica, la obtención de plantas libres de patógenos (virus, bacterias, etc), la producción de compuestos de interés para la industria de procesos (colorantes, aditivos, fragancias, principios activos, etc), la generación de plantas tolerantes o resistentes a determinadas condiciones ambientales (sequías, salinidad, estrés, etc), la obtención de variedades mejoradas; por mencionar algunas de las aplicaciones de este campo.¹¹

Una gran diversidad de especies han sido estudiadas por Cultivo de Tejidos Vegetales, el enorme potencial que presenta, el uso de esta técnica y la relevante contribución hecho al conocimiento, funcionamiento y manejo del reino vegetal muestra en las últimas décadas, el desarrollado de modelos biológicos que han aportado información muy valiosa acerca de la fisiología y bioquímica de las plantas.¹²

El CTV así como la transformación genérica de plantas, constituyen actualmente, la base de la Biotecnología Vegetal. El Cultivo de Tejidos Vegetales, puede definirse como: un conjunto de técnicas que utilizan la capacidad de regeneración y biosíntesis que poseen las plantas, para establecer cultivos de células, tejidos y órganos en condiciones asépticas y controladas de temperatura, humedad, nutrientes, pH, fotoperíodo, entre otras, obteniéndose así plantas completas o los productos de cualquiera de las rutas bioquímicas que se encuentran codificadas en el genoma de una planta.¹³

Street (1977) afirma que el término solo debe ser usado para referirse a tejidos que se originan por proliferación de segmentos (*explantes*) de órganos de una planta. Otra definición, se refiere al cultivo *in vitro* de cualquier parte de una planta, ya sea una sola célula, un tejido o un órgano, bajo condiciones asépticas.

Esta técnica está basada en la teoría de la totipotencialidad celular, propuesta por primera vez por Schleiden y Shwanm (1839) que menciona: *cada célula de una planta, tiene la información genética para regular la división y la diferenciación celular, para el crecimiento y regeneración de una planta nueva.*¹⁴

El alemán G. Haberlandt a principios de este siglo (1902) retoma este término, y aunque no tiene éxito en sus investigaciones, menciona que: *es posible manipular los tejidos vegetales in vitro si se les proporciona las condiciones adecuadas.*¹⁴

En 1932 J.P.White obtiene por primera vez el cultivo indefinido de raíz usando extremidades tomadas de la raíz de tomate, que coloca en un medio líquido que contenía sales minerales, extracto de levadura y azúcar, sin duda este éxito dejó lugar a esfuerzos renovados por el CTV. En 1934 R.J.Gautheret obtuvo a partir de meristemas de árbol, proliferación de tejidos que no vivieron más de ocho meses.

Sin embargo, no fue sino hasta 1939 cuando Nobercurt y Gautheret reportan que los tejidos de raíz de zanahoria proliferan como una masa de tejido desorganizado, cuando se colocan en un medio nutritivo que contenía minerales, glucosa, cisteína, sales y el regulador de crecimiento ácido indolacético (AIA), esta proliferación conocida como callo, se podía mantener en un cultivo por tiempo indefinido mediante el subcultivo de pequeños fragmentos de callo a medio fresco.¹⁴

En el mismo año White, independientemente, reporta cultivos de tejido calloso, provenientes del *procambium* de segmentos de tallo de una especie de *Nicotiana*. A partir de este momento la técnica de CTV fue tomando gran importancia para realizar investigaciones, no sólo a nivel de comportamiento celular, sino en diversas áreas del conocimiento.¹¹ En la Tabla I se mencionan algunas aplicaciones del Cultivo de Tejidos Vegetales.

TABLA I. APLICACIONES ACTUALES Y FUTURAS DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.¹⁵

TECNOLOGÍA APLICADA	TECNOLOGÍA EN DESARROLLO
<ul style="list-style-type: none"> • Micro propagación • Embriogénesis somática • Eliminación de virus • Recuperación de embriones • Producción de haploides • Manipulación de la haploidia • Almacenamiento y transporte de germoplasma. • Producción de compuestos químicos por células cultivadas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Modificación por variación somoclonal • Transferencia de genes vegetales por fusión de protoplastos • Introducción de genes por <i>Agrobacterium</i> o por otros medios (las consecuencias incluyen la introducción de resistencia, a enfermedades, plagas y herbicidas, así como el control del desarrollo vegetal)

1.1.1 PROPAGACIÓN DE PLANTAS.

La generación de plantas, a través de ciclos relativamente cortos, bajo condiciones controladas y asépticas, con características superiores, como alta productividad, resistencia a plagas y condiciones ambientales adversas o bien, la producción de alguna sustancia específica, son los objetivos que se persiguen al trabajar esta técnica, también conocida como micropropagación o propagación clonal.¹⁶

El primer paso consiste en seleccionar a la planta que se desea propagar y buscar las condiciones que permitan el establecimiento del cultivo en el laboratorio; un cultivo en condiciones asépticas, para lo cual se hace uso de diferentes agentes desinfectantes que eliminan la carga de microorganismos presentes en la superficie de la planta o tejido.¹⁷

A la parte de tejido de la planta que se cultiva en medios de cultivos adecuados se le denomina "explante" o inóculo, que puede ser desde un fragmento de hoja, tallo, raíz, hasta embriones, semillas e incluso la planta completa.

Una vez establecidos los cultivos en condiciones asépticas, se evalúa el efecto de los diferentes componentes del medio (tratamiento de desinfección - porcentajes de contaminación en medios de cultivo-, la oxidación de tejidos), así como de las condiciones de incubación.¹⁷

Uno de los factores que mayor influencia tienen sobre el tipo respuesta *in vitro* de las plantas son los *reguladores de crecimiento vegetal*, también conocidos como hormonas vegetales, las cuales son sustancias que en baja concentración ejercen gran influencia sobre la diferenciación y el desarrollo de las células vegetales.^{17 y 18}

Actualmente, se reconocen cinco tipos básicos de sistemas químicos de reguladores de crecimiento vegetal,¹⁸ divididos en tres grupos principales:

- a) Promotores del crecimiento: auxinas, citocininas y giberelinas. (Tabla II y Figura 1)
- b) Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico.
- c) Etileno.

De los cinco sistemas químicos incluidos en este grupo, las giberelinas promueven la germinación, junto con las auxinas estimulan principalmente la elongación celular y las citocininas estimulan la división celular.¹⁸

TABLA II. REGULADORES DE CRECIMIENTO MÁS UTILIZADOS EN CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.^{17 y 18}

AUXINAS	CITOCININAS	GIBERILINAS
Ac Indol-3-acético (AIA)	6-Bencilaminopurina (BAP)	Ac Giberílico (GA ₃)
Ac Indol-3-butírico (AIB)	Isopentiladenina (2iP)	
Ac Naftalenacético(ANA)	Zeatina (Z)	
Ac 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)	Cinetina (K)	

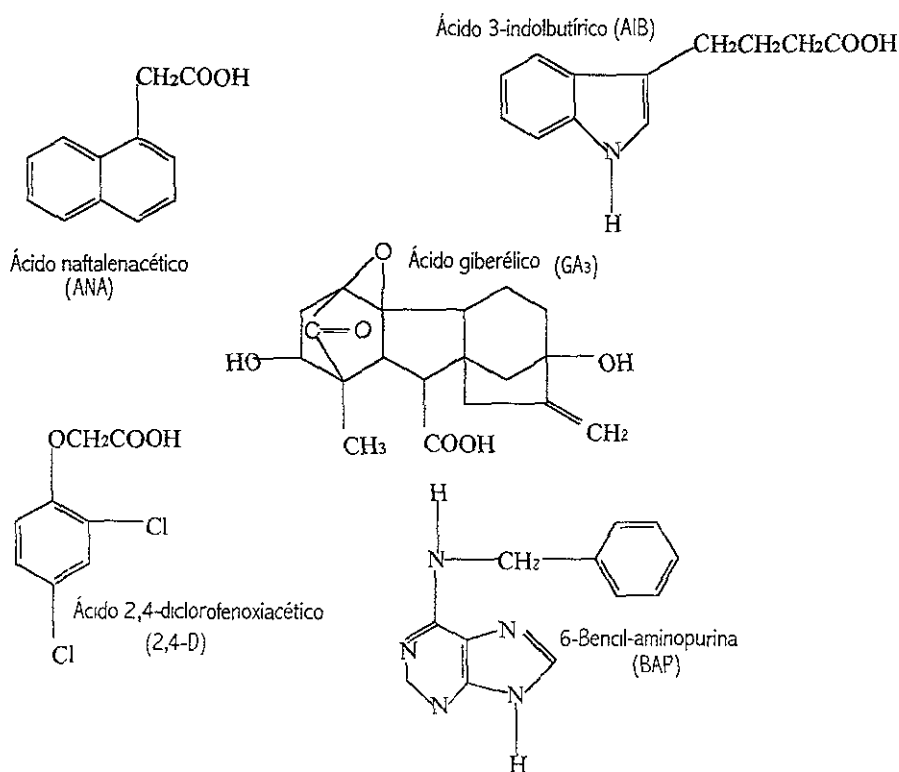


Figura 1. Estructuras químicas de algunos reguladores de crecimiento

El ácido abscísico es el único grupo químico que pertenece a los inhibidores, y provoca la caída de hojas, flores y frutos en las plantas.⁷ El etileno regula el crecimiento vegetal, su producción es mayor en yemas laterales y decrece lentamente en hojas y flores en expansión; existe un incremento en su producción durante la senescencia y la abscisión de tejido floral y foliar, indicando que el etileno juega un papel activo en la regulación de la caída de hojas y flores.^{1b}

1.1.1.1 RESPUESTA MORFOGENÉTICA

Cuando se cultiva en el laboratorio una especie, se busca un tipo de respuesta o se persigue un objetivo predeterminado en función del tipo de proceso biotecnológico que va a desarrollarse, por ejemplo si se cultiva un meristemo, se busca obtener plantas libres de virus, el meristemo al ser una zona de activo crecimiento no permite el establecimiento de patógenos, por lo que al ser extraído y cultivado *in vitro* existe la posibilidad de obtener plantas libres de virus o patógenos, o si se cultivan anteras, se busca generar plantas haploides (con un juego impar de cromosomas).^{19 y 20}

En otros casos se cultivan brotes y yemas para lograr la multiplicación de los mismos, estableciendo procesos de propagación en varias etapas, sin embargo existen limitaciones, algunas impuestas por el mismo material vegetal, por ejemplo, no siempre es posible mantener la estabilidad genotípica y en consecuencia la fenotípica en cada subcultivo, en los dos procesos mencionados se busca la proliferación de estructuras ya diferenciadas.²¹

Otras alternativas, consisten en inducir nuevos estados de diferenciación en las células cultivadas, es decir, dirigir las hacia procesos conocidos como la *organogénesis* mismo que consiste en la formación de órganos aislados, como brotes ó raíces a partir del inóculo sembrado, el cual se encuentra dentro de la planta en un estado de diferenciación determinado que, una vez en cultivo, puede ser dirigido a otro destino, lo que de manera natural sería prácticamente imposible y que se reconoce como *embriogénesis somática*.^{22 y 23}

Una alternativa más, consiste en generar estructuras de células desorganizadas, de gran potencial biotecnológico, que recibe el nombre de callos. La *callogénesis* es la reproducción de células para dar una masa amorfa, originada por sucesivas divisiones mitóticas. La cual puede originar la formación de brotes o raíz - *organogénesis indirecta*-cuando este proceso no llena una fase intermedia de callo se le conoce como: *organogénesis directa*; en ambos casos se busca llegar a formar la planta completa con la inducción de raíz o brotes según sea el caso, de la misma forma que otros esquemas, se debe establecer ciclos de propagación y multiplicación.^{24 y 25}

La *embriogénesis somática* consiste en la inducción y formación de estructuras bipolares, muy semejantes a los embriones sexuales, con la diferencia de que no son producto de fusión gamética, existe una gran cantidad de estudios para establecer líneas, semejanzas y diferencias a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico; principalmente por el amplio potencial biotecnológico que implica el proceso.²⁴

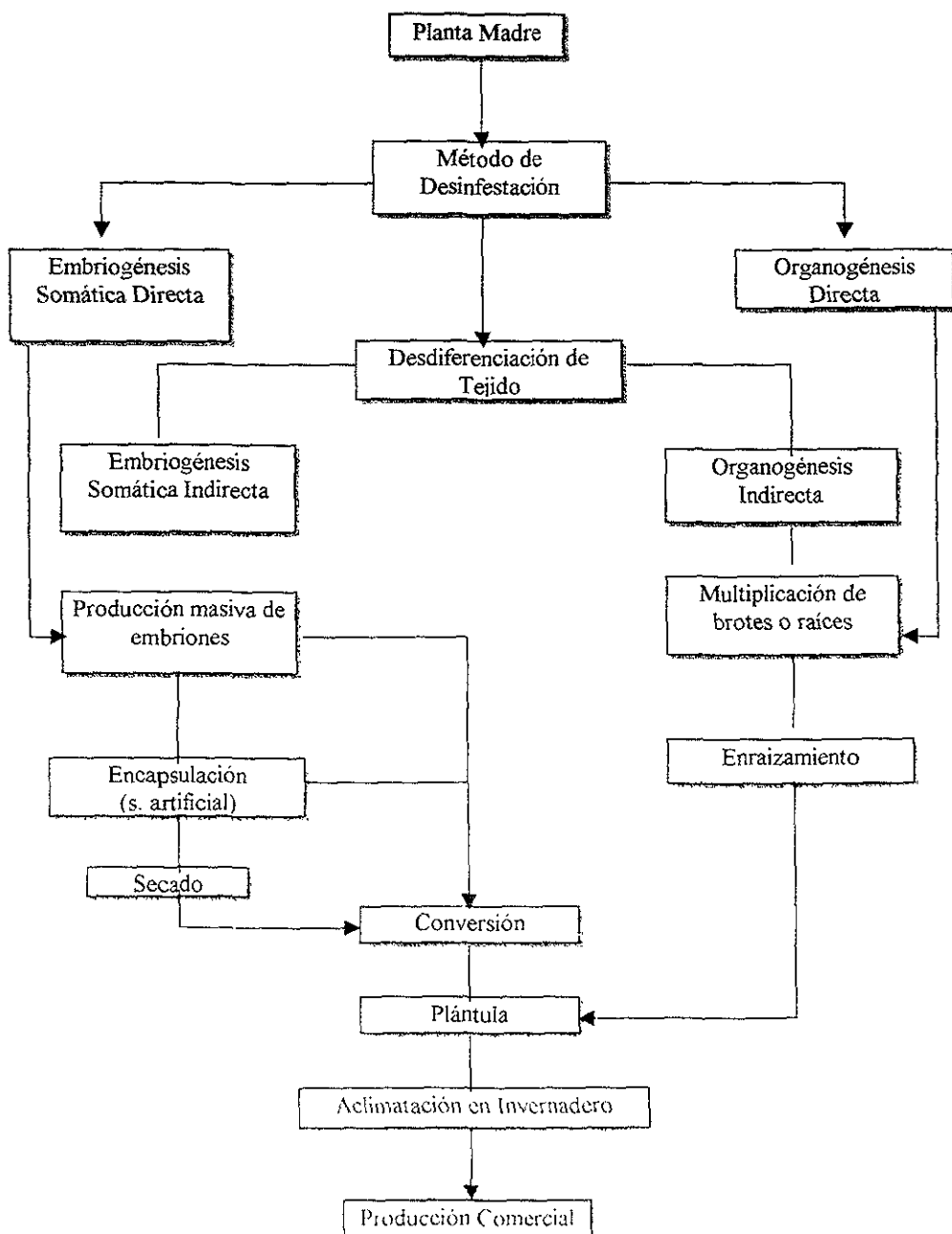
Teóricamente cada célula de un tejido tiene la capacidad de producir un individuo completo, la existencia de miles de células en un pequeño fragmento de tejido, plantea la posible producción de miles de plantas a partir de miligramos de tejido.

Cuando la producción de plantas por embriogénesis somática ocurre por un paso intermedio de callo se le denomina *embriogénesis somática indirecta*, en el caso contrario se le llama *embriogénesis somática directa*. El proceso de embriogénesis plantea un potencial de producción de plantas mucho mayor, que otros procesos en donde la tasa de multiplicación real es de cientos o miles; no obstante se deben de superar varios retos, uno es el escalamiento en la producción de embriones somáticos con cultivos en suspensión ó en biorreactor, el desarrollo de la tecnología de producción de "semillas artificiales". Donde tendrá un gran impacto en la agricultura, primero en especies de alto valor unitario y posteriormente en otras especies importantes.²⁴

La aplicación del proceso no termina con la producción masiva de plantas, independientemente de la ruta de propagación, es necesario llevar a cabo la aclimatación y establecimiento de plantas de invernadero ó campo, en esta etapa se requiere de una gran cantidad de trabajo manual. En la adaptación se puede perder una gran cantidad de plantas por su sensibilidad a las nuevas condiciones, también es necesario evaluar las características de productividad de las plantas obtenidas *in vitro*, asociadas con estudios económicos-administrativos que permitan ganancias económicas y otros beneficios.²¹

En el diagrama 1 se resumen los diferentes procesos y rutas morfogénéticas para la propagación clonal con la Técnica de Cultivo de Tejidos.

DIAGRAMA 1. PROPAGACIÓN CLONAL POR CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.



1.1.2 OBTENCIÓN DE SUSTANCIAS CON APLICACIÓN INDUSTRIAL

Las plantas son fuente de una amplia diversidad de sustancias, muchas de ellas de uso cotidiano en diferentes industrias ó para diferentes procesos. En una célula vegetal existe una gran maquinaria bioquímica que permite la síntesis de sustancias, que por métodos químicos, en muchos casos no es posible obtener, dichos compuestos han existido en las plantas por miles de años son producto de la evolución, y aún no se sabe exactamente cuál es su función que desempeñan dentro de la planta.²⁵

Sin embargo, de manera general se considera que tienen un papel ecológico y que son un medio que permite a la planta mayor adaptación y supervivencia respecto a su entorno, pero que el hombre usa para aumentar su calidad de vida.²⁵

La obtención de estas sustancias –denominadas metabolitos– a partir de las plantas, del cultivo de células vegetales y su producción a nivel comercial se empezó a vislumbrar desde hace ya varias décadas. El primer producto a nivel comercial fue la *Shikonina*, sustancia con aplicación doble, en la industria farmacéutica y en la cosmética cuya producción se realiza en Japón. En la actualidad existen diferentes procesos ya escalados ó en proceso de escalamiento a nivel industrial para la producción de sustancias a partir de células vegetales. (Tabla III).²⁶

Los primeros pasos de la metodología para la obtención de un metabolito por cultivo de tejidos son similares a la propagación clonal, se selecciona una planta con base en su potencial biotecnológico y se establece el cultivo en condiciones asépticas. Una condición muy general es la inducción de callo con el uso de reguladores del crecimiento en medio con agar, después viene el cultivo en suspensión en matraces de vidrio para evaluar la cinética de crecimiento de las células, tiempos de duplicación, los factores que controlan el desarrollo de los cultivos y la identificación del o los metabolitos de interés.^{26, 27}

TABLA III. FÁRMACOS OBTENIDOS POR CULTIVO DE CÉLULAS DE PLANTAS SUPERIORES.²⁸

COMPUESTO	ESPECIE DE PLANTA	RENDIMIENTO ESPECÍFICO (% MASA SECA)	RENDIMIENTO TOTAL (mg/L)	TIPO DE CULTIVO
Diósgenina para esteroides	<i>Dioscorea deltoidea</i>	7.8	150	Suspensión
Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	0.1	4	Suspensión
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	0.1	5	Suspensión
Atropina	<i>Atropa belladonna</i>	0.4	-	Raíces transformadas
Hioscyamina	<i>Duboisia leichhardtii</i>	0.5	15	Cultivo de raíz
Scopolamina	<i>Duboisia leichhardtii</i>	1.2	40	Cultivo de raíz
Digoxina	<i>Digitalis lanata</i>	0.002	<1	Cultivo líquido
Digitoxina	<i>Digitalis lanata</i>	0.01	<1	Cultivo líquido
Quinina	<i>Cinchona ledgeriana</i>	0.01	<1	Raíces transformadas
Quinidina	<i>Cinchona ledgeriana</i>	0.03	<1	Raíces transformadas
Reserpina	<i>Rauwolfia serpentina</i>	0.5	6	Suspensión

Todas las productividades se calcularon con base al tamaño y forma del experimento sin exceder un volumen de cultivo de 100mL.

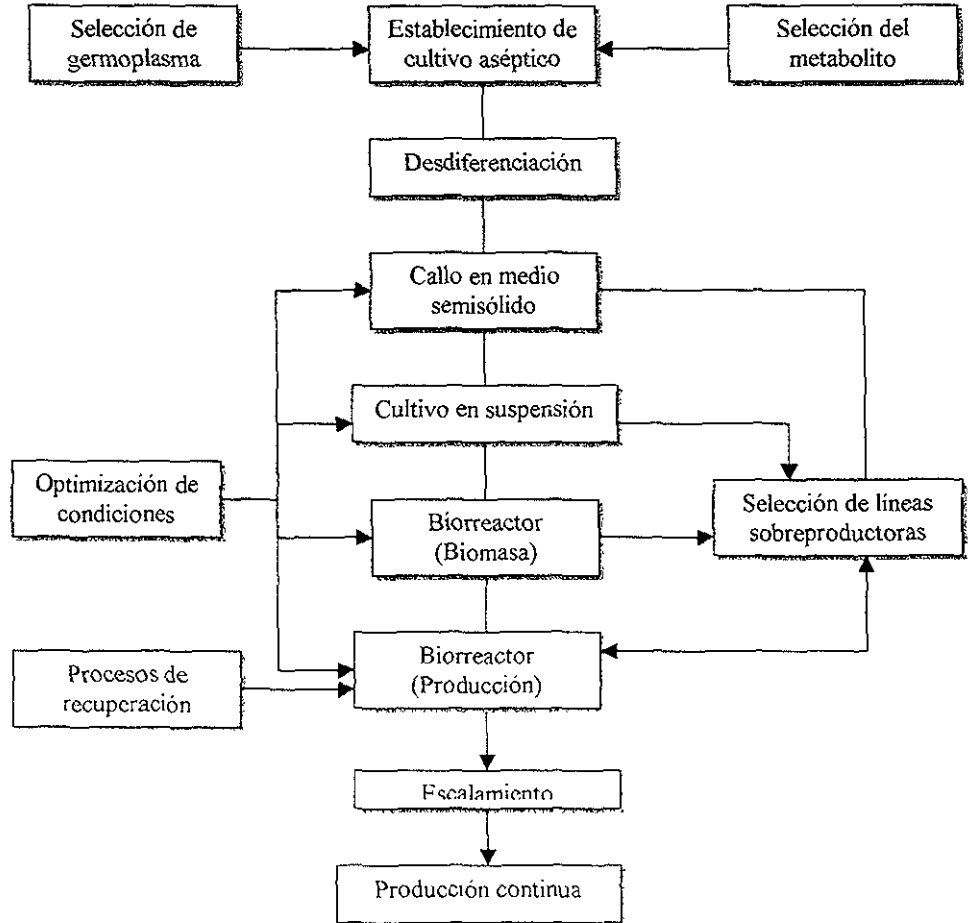
Es característica de muchas líneas celulares de plantas que la producción del metabolito no este asociada al crecimiento, es decir primero ocurre la producción de biomasa y posteriormente la del metabolito, también que los metabolitos de interés se almacenan en estructuras intracelulares, lo que con lleva al desarrollo de procesos en dos etapas y la necesaria lisis celular para la obtención del metabolito, incrementándose los tiempos de proceso y los costos de producción. Evaluando el comportamiento del cultivo, consumo de nutrientes, efecto de promotores e inhibidores, condiciones de agitación, luz, fotoperíodo, agregación y disgregación de las células, etc.

En los primeros cultivos de células a nivel de biorreactor se utilizaron aparatos diseñados para células bacterianas, no obstante las diferencias son muy grandes, una célula vegetal es 10-20 veces más grande que una bacteria, lo que las hace más sensibles a las fuerzas de corte en un biorreactor, el tiempo de duplicación es de 2-4 días en comparación con bacterias que es de horas ó decenas de minutos en condiciones óptimas, al duplicarse una célula bacteriana no permanece en agregados como lo hacen las células vegetales, la sensibilidad a variaciones en parámetros como pH, concentración de sustancias, etc. en las condiciones de cultivo es mayor en células vegetales que en bacterias y como se menciono las células vegetales almacenan en sus vacuolas a los metabolitos, en bacterias muchas sustancias se excretan al medio.^{28, 29 y 30}

Además de lo anterior, existen puntos críticos a considerar, uno es la estabilidad de las líneas celulares, en ocasiones se obtienen líneas con una productividad mucho mayor que la planta en condiciones naturales, sin embargo la alta producción se puede perder por causas poco conocidas en el tercer ó cuarto subcultivo y en muchas ocasiones no se tienen contemplados procesos de recuperación del metabolito que sean eficientes.^{31 y 32} En el diagrama 2. se muestra la producción de metabolitos por cultivo de tejidos vegetales.³³

La amplia variedad de sustancias en el reino vegetal, los altos costos de diferentes metabolitos, el desarrollo de procesos biotecnológicos que causan menor impacto en el ambiente y el conocimiento cada vez mayor de la diferenciación y el metabolismo de las células vegetales preveen que este tipo de tecnología irrumpirá necesariamente en nuestra vida diaria.^{79 y 35}

DIAGRAMA 2. PRODUCCIÓN DE METABOLITOS POR CULTIVO DE CÉLULAS VEGETALES.



1.1.3. TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS

Las aplicaciones comerciales del cultivo de tejidos vegetales, se verán potenciadas en gran escala con el uso de las técnicas de la ingeniería genética de plantas. Actualmente existen una gran cantidad de reportes en donde se ha logrado expresar material genético de otros organismos en las plantas confiriéndoles características como resistencia a sequías, insectos, salinidad etcétera, lo que plantea una revolución en la agricultura.²¹

El impacto del cultivo de tejidos y la ingeniería genética dependerá de su complementariedad y desarrollo conjunto, existen miles de especies que pueden ser propagadas con éxito por cultivo de tejidos y muchas más que aún no han sido estudiadas, curiosamente algunas de las especies de leguminosas y cereales sobre las que descansa la alimentación humana, no han sido posible propagarlas de manera eficiente, de la misma forma del lado de la ingeniería genética aún cuando existen ya diferentes métodos para transformar a un individuo, en este caso transferir y expresar un gen en una planta, su aplicación a la fecha es limitada.³⁴

Así, si se cuenta con plantas de cultivos importantes en donde se tienen bien establecidos sistemas de propagación clonal y por otro lado un adecuado sistema de transformación genética, entonces hay grandes posibilidades de lograr una aplicación comercial.^{20 y 21}

El método de transformación genética más utilizado es el uso de diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, la cual se co-cultiva *in vitro* en diferentes concentraciones con los tejidos que se desea transformar, esta bacteria fitopatógena tiene de manera natural la capacidad de infectar y transferir parte de su información genética a la planta que infecta, esta última incorpora a su genoma dicha información y puede expresarla de manera estable.²⁰

La transformación genética de plantas también plantea su uso, para la obtención de metabolitos secundarios a través de la inducción de raíces vellosas ("hairy roots") y su cultivo en suspensión. En grupos de investigación se ha tenido éxito en la transformación y obtención de raíces vellosas de *Armoracia lapathyfolia* (horseradish) y *Perezia cuernavacana* (pipitzahua), las cuales producen respectivamente, la enzima peroxidasa, de gran importancia en pruebas de tipo inmunológico y un colorante vegetal que tiene aplicación en la elaboración de tintas para la industria de las artes gráficas.¹¹

1.2 PLANTAS CON PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS.

En los últimos años han aparecido trabajos sobre diversas familias de plantas superiores, las cuales han hecho patente en ellas la presencia de sustancias con actividad farmacológica. En especial aquellas con propiedades antimicóticas, debido a que son escasos los antifúngicos comerciales, así como poco accesibles y con efectos colaterales inconvenientes.⁴ En la tabla IV se muestran solo algunas, de las que han sido estudiadas, el microorganismo de prueba y el compuesto aislado.³⁸

TABLA IV. ALGUNAS PLANTAS CON PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS Y SUS SUBSTANCIAS AISLADAS, DESCRITAS DESDE 1982-1993.³⁸

FAMILIA	ESPECIE	ÓRGANO	COMPUESTO (S) AISLADO	MICROORGANISMO DE PRUEBA
Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i> (mango)	Cáscara y carne del fruto inmaduro	5-(12-cis-Heptadecenil)-resorcinol	<i>Alternaria alternata</i>
Burseraceae	<i>Commiphora rostrata</i>	Corteza del tallo	2-decanona, 2-undecanona, 2-dodecanona	Especies de <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i>
Cannabidaceae	<i>Humulus lupulus</i>	Resina	6-Isopentenilnaringenina xantohumol	<i>Trichophyton rubrum</i> <i>T. mentagrophytes</i>
Euphorbiaceae	<i>Croton lacciferus</i>	Raíz	2,6-dimetoxibenzoquinona	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
Graminae	<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	Vaina	α -triticena, β -triticena	<i>Cladosporium cucumerinum</i>
Gramineae	<i>Sorghum cultuvars</i>	Vaina y granos	Flavan-4-oles	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Curcularia lunata</i>
Solanacea	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	Frutos verdes	Tomatina	<i>Fusarium solani</i>
Sterculiacea	<i>Theobroma cacao</i> (cacaó)	Tejido nuevo de un vástago	Proclanidina Polimérica	<i>Campyella pernicioso</i>
Muticaceae	<i>Psidium acutangulum</i>	Vaina	3-Formil-2,4,6-trihidroxidihidrochalcona	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Helminthosporium teres</i>

1.3 GENERALIDADES DEL GÉNERO *Beschorneria*

El género *Beschorneria* fue establecido por Kunth en 1850, basándose en una especie previamente descrita en 1847 por él y Bauche como *Fourcroya tubiflora*. La planta en la cual se basó Kunth fue enviada por Ehrenberg de México y floreció en el Jardín Botánico de Berlín en 1844.

El género y la mayoría de las especies fueron descritas de plantas vivas exportadas a Europa como novedades ornamentales en el siglo XIX, desconociéndose las localidades exactas donde fueron colectadas y los años en que ocurrió esto. Las plantas se enviaron de México en forma de semilla por Ehrenberg y Roehl. Los sitios de introducción principales fueron el Jardín Botánico de Berlín y los Jardines Botánicos de Kew en Inglaterra; de ahí las plantas pasaron a un sin número de jardines, tanto públicos como privados en los países del norte y centro de Europa, como Holanda, Inglaterra, Alemania, Bélgica, Austria, Rusia y Suiza; se les cultivó en invernaderos y en contadas ocasiones a la intemperie con protección durante el invierno.^{2,3}

El género se lo dedicó Kunth a su amigo Friedrich Wilhelm Christian Beschorner (*23.III.1806 - 20.XII.1873), Director del manicomio en Owinsk cerca de Posen, actualmente Polonia. Posteriormente a esta primera descripción, la historia de las especies se vuelve complicada, apareciendo los nombres subsiguientes en revistas de horticultura de varios países de Europa.^{2,3}

Koch (1860) describió brevemente *B. yuccoides* que a decir de él, ya se había propagado por los jardines de Europa varios años atrás, junto con otra planta que tenía el nombre de *B. multiflora*. En el mismo año y pocos meses después que Koch, Hooker describió con el mismo epíteto, una planta diferente a la de este botánico y, que mantenía el mismo nombre en los jardines de Inglaterra. La confusión se dio por ser plantas muy semejantes y, sólo alguien que las viera juntas podría diferenciarlas. Aparentemente Ehreberg introdujo la planta descrita por Koch en los años de 1832-1839 y Roehl introdujo la planta descrita por Hooker en 1857 de Zacatlán, Puebla.

Schlechtendal (1863), basándose en la descripción y dibujo de *B. yuccoides*, Hooker dio más datos acerca de la caracterización del género, detallando cuidadosamente las flores y partes del fruto que no se conocían. Este hecho motivó una discusión entre él y Koch acerca de la verdadera *B. yuccoides*. En el mismo año, Koch durante una exhibición de plantas en Bruselas, vio la planta descrita por Hooker, señalando que su análisis no deja en duda de la diferencia entre las dos especies, por lo que decide cambiar el nombre de *B. yuccoides* por el de *B. dekoesteriana*.^{2y3}

Beschorneria a lo largo de todos los sistemas de clasificación y de los estudios sobre morfología, citología, anatomía y palinología, ha estado siempre ligada a los géneros *Agave*, *Mesfeda*, *Furcraea*, *Polianthes* y *Yucca*. Actualmente forma parte medular de la familia Agavaceae. Por las características que presenta este género y por la metodología taxonómica, la clasificación botánica se muestra en la Tabla V.

TABLA V. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA³⁵

Reino	Vegetal
División	Angiospermas
Clase	Monocotiledónea
Orden	Asparagales
Suborden	Agavacea
Familia	Agavaceae
Subfamilia	<i>Agavoideae</i>
Género	<i>Beschorneria</i>
Especie	<i>Yuccoides</i>

1.3.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Beschorneria yuccoides es una planta herbácea, perenne, presenta hojas arrosetadas verde glauco de 30 a 100 cm de longitud linear y lanceoladas, inflorescencia de 1.5 a 2.0 m de largo ponículadas y púrpuras casi en su totalidad, con 80 o más ramillas florales bracteadas desde la base, sus flores son péndulas de 5 cm de longitud en promedio, su fruto es subgloboso de 3-5 cm (Figuras 2 y 3), con numerosas semillas blancas y negras.³⁵



Figura 2. Fotografía de *Beschorneria yuccoides* C Koch, con inflorescencia.

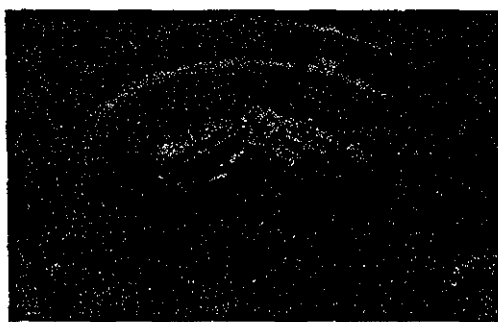
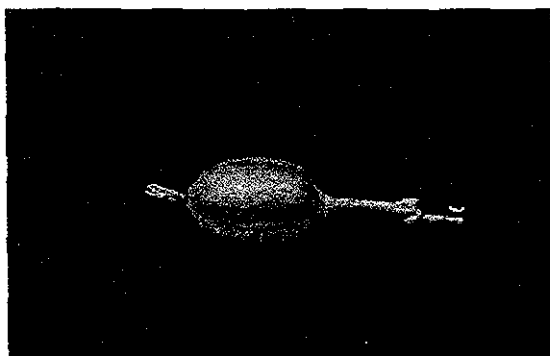


Figura 3 Fruto maduro de *Beschorneria yuccoides* C Koch.

1.3.2 DISTRIBUCIÓN

El género *Beschorneria* cuenta con siete especies y una subespecie, distribuidas en México y en algunas regiones de Centro América. El género se presenta a lo largo de la Sierra Madre Oriental y pequeñas sierras aledañas del mismo origen, desde los límites entre Nuevo León y, a través de San Luis Potosí, Guanajuato, Hidalgo, Puebla y Veracruz, hasta el Pico de Orizaba, sobre el eje Neovolcánico. En Guatemala se localiza en las zonas montañosas. *B. yuccoides* crece en el norte de Puebla, este de Hidalgo y centro de Veracruz.^{7 y 35}

Algunas especies del género colonizan principalmente regiones rocosas, protegidas o expuestas dentro de los bosques de pino-encino. Todas las especies crecen invariablemente en las grietas de las rocas, sobre acumulaciones de suelo que existen entre ellas, o en pocos casos sobre substratos más o menos profundos; en todas los casos el suelo es rico en materia orgánica. Las especies son típicas de las partes altas de las sierras, por arriba de los 1600 hasta los 2400 msnm.

1.3.3 USOS

Algunas especies de *Beschorneria* son plantas valiosas económicamente al menos para algunas poblaciones indígenas en México y Guatemala. Las plantas del género tienen una variedad de usos, tanto del rizoma como de las hojas, flores y en ocasiones el péndulo floral. La especie más utilizada es *B. yuccoides* y los usos más importantes que se le dan se muestran en la Tabla VI.

TABLA VI. USOS TRADICIONALES DE *Beschorneria yuccoides*.^{2 y 35}

PARTE DE LA PLANTA	USO
Planta completa	<ul style="list-style-type: none"> • Delimitar terrenos • Ornamental
Tallo	<ul style="list-style-type: none"> • Alimento
Eje de la inflorescencia	<ul style="list-style-type: none"> • Alimento
Flores	<ul style="list-style-type: none"> • Alimento
Hojas	<ul style="list-style-type: none"> • Macerada en agua se emplea para limpieza de utensilios de cocina, ropa, etc, en el aseo personal, así como el de algunos animales domésticos • Extracción de fibra para hacer huaraches • <u>terapéutico</u>: para curar golpes y enfermedades de la piel como la caspa y las dermatofitosis o tiñas en humanos y animales

1.3.4 FITOQUÍMICA

Los compuestos predominantes en la familia *Agavacea* son de tipo esteroidal, encontrándose en forma de saponinas, que por hidrólisis dan origen a las sustancias libres de azúcares llamadas sapogeninas. En la industria además de ser indispensables como fuente de obtención de productos hormonales, lo son para sintetizar gluocósidos cardíacos, corticoides y precursores de la vitamina D₂.⁹

Hallándose además de saponinas esteroidales (Tabla VII), ácido quelidonico y las hojas pueden contener cierta cantidad de ácido ascórbico y aceites esenciales en algunas especies con flores fragantes.^{35 y 36}

TABLA VII. METABOLITOS AISLADOS DEL GÉNERO *Beschorneria*.^{35 y 36}

TIPO DE METABOLITO SECUNDARIO	COMPUESTO
SAPOGENINAS	HECOGENINA
	SARSASAPOGENINA
	MANOGENINA
	TIGOGENINA
	YUCAGENINA
	SISALAGENINA
	AGAVOGENINA
	ESMILAGENINA
	DIOSGENINA
	BESHIONINA
	BESCHORNOSIDO
AZÚCARES	GALACTOSA
	GLUCOSA
	RHAMNOSA

1.4 ESTUDIOS ETNOBOTÁNICOS, MICROBIOLOGÍCOS Y EDAFOLOGÍCOS DE *B. yuccoides* C. Koch

La última revisión bibliográfica realizada a *B. yuccoides*, se encuentra un estudio multidisciplinario, realizando investigaciones en las áreas de etnobotánica, microbiología y edafología, estableciéndose de esta manera que *B. yuccoides* está, ahora más que nunca, en peligro de extinción y necesita de una propagación masiva para su conservación y uso futuro.

A través del estudio etnobotánico se precisó el área de distribución y localidades de estudio, se obtuvo información fitosociológica y de morfología de la especie; relaciones con el hombre: condiciones de habitat, propagación, usos, importancia para la comunidad, siendo fundamental la obtención de muestras para ejemplares de herbario, para análisis fitoquímico, plantas completas y semillas para siembra en suelo y para cultivo de tejidos, así como la recolección de dieciocho muestras de suelo de localidades donde habita esta planta.⁴

Está relacionada con las comunidades nahuas, totonacas y mestizas; no existen evidencias prácticas de cultivo; generalmente se encuentra formando colonias y su propagación es vegetativa. Esta especie ya no existe en algunas localidades de la pequeña área de distribución notificada por García en 1987 y se encuentra en peligro de extinción.

Los extractos acuosos y etanólicos de las hojas presentan, entre otros componentes, saponinas, que pueden ser responsables de la actividad antimicótica en varios hongos dermatofitos.

Los resultados del estudio microbiológico muestran que el extracto acuoso de hojas tuvo una actividad antifúngica sobre seis hongos de prueba. (Tabla VIII), mientras que el extracto metanólico de tallo únicamente inhibió el crecimiento del hongo *Aspergillus fumigatus*. Con relación a la concentración mínima inhibitoria (CMI), la más baja registrada fue de 0.78 mg/ml para *T. rubrum* y de 1.56 mg/ml para *M. canis* con los dos extractos de hojas.

TABLA VIII. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE EXTRACTOS CRUDOS DE *Beschorneria yuccoides*.⁴

HONGO DE PRUEBA	ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA			CMI (mg/mL)		
	EMH	EMT	EAH	EMH	EMT	EAH
<i>M. gypseum</i>	+	-	+	3.13	-	0.39
<i>M. canis</i>	+	-	+	1.56	-	1.56
<i>T. rubrum</i>	+	-	+	0.78	-	0.78
<i>C. carrioni</i>	+	-	+	25.00	-	25.00
<i>C. albicans</i>	-	-	+	-	-	1.56
<i>A. fumigatus</i>	+	+	+	6.25	25	3.13

EMH: Extracto metanólico de hojas, EMT: Extracto metanólico de tallos y EAH: Extracto acuoso de hojas

Los resultados del estudio edafológico muestran que la planta crece en suelos ricos en materia orgánica, con pH ácido y alto contenido de humedad, así como ricos en calcio y con textura de suelo franco o franco-arenoso. *Beschorneria yuccoides* no requiere de prácticas especiales de cultivo

La importancia de propagar a esta especie no solo recae por ser una planta en peligro de extinción, el uso medicinal como antifúngico es otro factor de interés. Sin embargo, la razón más apremiante y a la cual se le atribuyen el efecto antifúngico es la cantidad de compuestos esteroidales presentes en forma de saponinas.¹⁵

Las saponinas son heterósidos con genina esteroídica o triterpénica, caracterizada principalmente por sus propiedades tensoactivas: se disuelve en agua formando espuma, aumentan la permeabilidad de las paredes celulares y destruyen los hematíes por hemólisis. Por hidrólisis de las saponinas se obtienen carbohidratos y una aglicona llamada genéricamente sapogenina.

El interés terapéutico e industrial de los triterpenos y de los esteroides, es el siguiente:

- a) Los glucósidos cardiorónicos, los cuales no se han podido todavía sustituir por ningún producto sintético.
- b) Las sapogeninas espirostánicas, sitoesteroles, estigmaesterol, que son materias primas difícilmente reemplazables para cubrir las necesidades de la industria farmacéutica en hormonas esteroídicas (anticonceptivos, antiinflamatorios, anabolizantes,...).
- c) Numerosas drogas con saponósidos, utilizadas para extraer sustancias activas (escina, glicirrina) o para obtener preparados galénicos, utilizados con frecuencia.
- d) Importancia económica del regalíz, edulcorante no azucarado y aromatizante.
- d) Importancia económica de los saponósidos, en cuanto a que su presencia puede disminuir de manera importante el valor nutritivo de forrajes como la alfalfa.
- f) Posible interés de los cuasinoides antitumorales.⁵

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Desde sus inicios, el desarrollo cultural de la humanidad ha estado ligado al uso y conocimiento de las plantas. En la lucha diaria por su supervivencia, las primeras sociedades aprendieron a distinguir frutos, follajes y raíces de plantas comestibles de aquellas que no le aportan ningún beneficio, o incluso le resultaban perjudiciales. El hallazgo más importante para los primeros hombres fue, sin duda el surgimiento de la agricultura, donde se dio inicio, al conocimiento del ciclo de vida de las plantas y así mismo un proceso de selección de especies y variedades de ellas que hoy constituyen uno de los más grandes acervos de la humanidad.³⁹

Sin embargo, esta selección no ha respondido eficientemente, ya que en muchos casos se han modificado tanto sus características, que han perdido la capacidad de crecer normalmente en su hábitat o bien esta capacidad se ha visto limitada. La pérdida de esta característica puede ser atribuida principalmente a la explotación irracional y a los cambios ecológicos provocados por el hombre. Originando en lo últimos años grandes problemas ambientales que han pasado a ocupar un sitio relevante en las preocupaciones de las colectividades de diversas regiones del mundo y del país.

Las plantas empleadas en la medicina tradicional, no escapan a estos problemas. Tal es el caso de *Beschorneria yuccoides* C. Koch, planta valiosa económicamente, para algunas comunidades indígenas, por los usos que presenta como alimento, jabón natural y planta medicinal. Empleada en el tratamiento de micosis dérmica. No existe evidencia práctica de cultivo, por lo que esta especie debe ser primeramente protegida y propagada masivamente, para incrementar sus poblaciones naturales existentes, y así obtener información y germoplasma como recurso potencial para el futuro.

El aumento acelerado de la población mundial y la disminución de las superficies de campo en el presente siglo, son otros factores que ha conducido a al hombre hacia la búsqueda de nuevas alternativas para satisfacer sus necesidades más apremiantes. Una de estas alternativas es la Biotecnología Vegetal, que ofrece una enorme posibilidad para la producción de metabolitos de interés, así como la

propagación *in vitro* de plantas de importancia hortícola y medicinal. Donde toma un papel importante en la preservación de los recursos naturales y la biodiversidad, así como en el tratamiento de la contaminación ambiental y en los procesos de biorremediación de los ecosistemas alterados.

Por lo anterior, se pretende establecer un método biotecnológico viable, que enfoque el uso del cultivo de tejidos vegetales para la propagación y cultivo *in vitro* de *B. yuccoides*, estableciendo en primer instancia un método adecuado de desinfestación que reduzca la contaminación sistémica de la misma planta y de diferentes explantes; seleccionando así mismo, el inóculo de mejor respuesta morfogénica que conduzcan a la formación de una plántula. Para lo cual deberá de determinarse en segundo caso la concentración y los reguladores de crecimiento que favorezcan más rápido la inducción de tejido desdiferenciado. Y finalmente establecer cuales son las condiciones óptimas de siembra, incubación y mantenimiento del cultivo *in vitro* de *B. yuccoides*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar un método biotecnológico, por Cultivo de Tejidos Vegetales, para el Cultivo y Propagación *in vitro* de *Beschorneria yuccoide* C.Koch.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Establecer el método de desinfestación más adecuado para obtener material aséptico en diferentes explantes de *Beschorneria yuccoides*.
- b) Seleccionar el explante de mejor respuesta morfogénica, que conduzca a la formación de plántula.
- c) Determinar los reguladores de crecimiento y su concentración que favorezcan más rápido la respuesta morfogénica para la inducción de tejido desdiferenciado en diferentes explantes de *Beschorneria yuccoides*.
- d) Establecer las condiciones óptimas para la siembra, incubación y mantenimiento del cultivo *in vitro* de *Beschorneria yuccoides*.

4. HIPÓTESIS

Con base a estudios anteriormente realizados en el laboratorio de CTV de la ENCB, con agentes desinfectantes como: etanol al 70%, hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio a concentraciones de 4,10 y 20%, se espera que los explantes de hoja, tallo, raíz y botón floral -inmaduro- de una inflorescencia, al ser expuestos con estos agentes, eliminen la carga microbiana de dichos explantes. De igual manera se espera que los reguladores de crecimiento: ANA, AIA, 6-BAP, IBA, K y 2,4-D en concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0, 10.0 y 20.0 mg/L determinen una respuesta morfogénica que induzca la dediferenciación del tejido; con las condiciones de incubación de: temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo de 16/8 horas de luz/oscuridad.

5. METODOLOGÍA

MATERIAL

- Cajas Petri
- Vasos de precipitado
- Probetas
- Lámparas de alcohol
- Pinzas de disección
- Bisturí
- Matraces Erlenmeyer
- Matraces Aforados
- Rociador o aspersionador
- Mechero
- Frascos Gerber

REACTIVOS

- Alcohol etílico al 70% (Alcoholes Mena S.A de C.V.)
- Hipoclorito de sodio J.T. Baker L:C23154
- Hipoclorito de calcio J.T. Baker L: 11MC04
- Agar Sigma L: 1462
- Sacarosa J.T. Baker L:C87945
- ANA Sigma L:0369
- 6-BAP Sigma L:5211
- AIA Sigma L:2001
- Kinetina Sigma L:8124
- IBA Sigma L:2145
- 2,4-D Sigma L:6566
- Amortiguadora pH 7 Beckman L:12475
- Amortiguadora pH 4 Beckman L:14582

EQUIPO

- Potenciómetro Orión-Research, Modelo 601A, Serie:75117
- Autoclave AESA, Modelo CV/250, Serie: Nom-1-10644
- Campana de flujo laminar AESA, Modelo FP950, Serie: 1-01234

5.2 MATERIAL BIOLÓGICO Y SELECCIÓN DE EXPLANTES

Para el presente estudio se utilizaron plantas de *B. yuccoides* C.Koch recolectadas en el jardín botánico de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, identificada por la Bióloga Marina Villegas y de Gante del Departamento de Botánica, laboratorio de Etimología.

El material biológico del que se dispuso fue:

- a) Vástagos a través de la reproducción vegetativa de la planta
- b) Planta adulta.
- c) Botón floral (inmaduro) de una inflorescencia.

Del material biológico proporcionado, se optó por utilizar todos los explantes posibles como son: hoja, tallo, raíz y botón floral (inmaduro) como tal.

5.3 OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO EN CONDICIONES ASÉPTICAS

Para conocer el mejor tratamiento de desinfección del material biológico; se realizaron pruebas utilizando distintos agentes desinfectantes. En primer instancia agentes desinfectantes: etanol, hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio a diferentes concentraciones y diferentes tiempos de exposición con el material biológico "a", "b", "c", como lo muestra la Tabla IX.

TABLA IX. MÉTODOS DE DESINFESTACIÓN DE TALLO Y HOJA DE *B. yuccoides*.

MÉTODOS				
1		2		
	T.E. (min)	Conc: (%)	T.E (min)	Conc: (%)
ETANOL	2	70	2	70
Ca(ClO) ₂	15	4	5	10
NaClO	10	10	10	20

T.E.= Tiempo de exposición.

Conc = Concentración.

TABLA X. MEZCLA DE ANTIBIÓTICO Y FUNGICIDA UTILIZADAS COMO PRE-TRATAMIENTO DE DESINFESTACIÓN DE *B. yuccoides*.

	N.C.	P.A.	F.F.	CONT.	CONC.	MEZCLA
A	Garamicina	Gentamicina	Ampolleta	20mg/2mL	40mcg/L	I
F	Promyl	Benomyl	Polvo	50g/100g	5g/L	
A	Anitrin	Trimetroprim	Suspensión	240mg/30mL	7.2mg/L	II
F	Promyl	Sulfametoxazol	Polvo	1200mg/30mL	36mg/L	
F	Promyl	Benomyl	Polvo	50g/100g	5g/L	III
A	Tetrex	Tetraciclina	Cápsulas	500mg/cap	500mg/L	
F	Promyl	Benomyl	Polvo	50g/100g	5g/L	

N.C. = Nombre Comercial

P.A. = Principio Activo

F.F. = Forma Farmacéutica

CONT. = Contenido

CONC. = Concentración

A = Antibiótico

F = Fungicida

En un segundo caso, se procedió a utilizar una mezcla de antibiótico y fungicida con un período de exposición de 24 horas con el material biológico (Tabla X), y finalmente proceder con la aplicación de los tratamientos de desinfestación propuestos en las Tablas XI, XII y XIII. Fue necesario ir eliminando algunos agentes de desinfestación para evitar que el tratamiento fuera muy agresivo con el tejido.

TABLA XI. TRATAMIENTOS DE DESINFESTACIÓN-OXIDACIÓN PROPUESTOS PARA TALLO Y HOJA DE *B. yuccoides*.

MÉTODOS						
3		4		5		
	T.E. (min)	CONC (%)	T.E. (min)	CONC (%)	T.E. (min)	CONC (%)
ETANOL	2	70	3	70	3	70
Ca(ClO) ₂	15	4	-	-	-	-
NaClO	10	50	20	50	20	60
AC. ASC.	5	0.1	24 h	0.1	24 h	0.1
MEZCLA	-		-		I	

T.E. = Tiempo de Exposición

Conc = Concentración

AC. ASC = Ácido ascórbico

TABLA XII. TRATAMIENTOS DE DESINFESTACIÓN-OXIDACIÓN PROPUESTOS PARA TALLO Y HOJAS DE *B. yuccoides*.

MÉTODOS						
6		7		8		
	T.E (min)	CONC (%)	T.E. (min)	CONC (%)	T.E. (min)	CONC (%)
ETANOL	-	-	-	-	-	-
Ca(ClO) ₂	-	-	-	-	-	-
NaClO	20	80	20	60	30	60
AC. ASC.	24 h	0.1	24 h	0.1	24 h	0.1
MEZCLA	I		II		II	

T E = Tiempo de Exposición

Conc = Concentración

AC ASC = Acido ascorbico

TABLA XIII. TRATAMIENTO DE DESINFESTACIÓN-OXIDACIÓN PROPUESTOS PARA TALLO Y HOJA DE *B. yuccoides*.

MÉTODOS		
9		
	T.E. (min)	CONC. (%)
ETANOL	-	-
Ca(CLO) ₂	-	-
NaClO	30	60
AC. ASC.	24 h	0.1
MEZCLA	III	

T.E. = Tiempo de Exposición

Conc. = Concentración

AC ASC. = Ácido ascórbico

5.4 EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN

Para conocer la mejor respuesta y/o efectividad del tratamiento de desinfestación del material biológico, se valoró el porcentaje de contaminación de cada medio de cultivo sembrado.

$$\% \text{ de contaminación} = \frac{\text{Frascos contaminados}}{\text{Total de frascos sembrados}} \times 100$$

Los explantes de cada material biológico se sembraron en condiciones asépticas, en medios de cultivo con diferentes reguladores de crecimiento. Distribuyendo en la superficie del medio de 3 a 4 explantes y sembrando un promedio de 5 a 6 frascos por cada medio diferente de cultivo. Sometiéndolo un testigo y/o blanco para evaluar las condiciones óptimas de siembra. Los medios de cultivo fueron revisados periódicamente, cada tercer día en la primera semana y después cada semana, para conocer el efecto de cada tratamiento a los que fueron sometidos, registrando la presencia y ausencia de carga microbiana o fúngica.

5.5 MEDIOS DE CULTIVO Y REGULADORES DE CRECIMIENTO

En esta parte se describen los tratamientos que fueron utilizados para conocer el efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre diferentes explantes. Como primera parte se procedió a conocer la relación de auxina/citocinina utilizando los medios de cultivo de Murashige y Skoog -MS- (Anexo I y II).⁴²

Complementados con 5.0 mg/L de clorhidrato de tiamina , 100 mg/L de mio-inositol, y diferentes reguladores de crecimiento (ANA, AIA, IBA, 6-BAP, K y 2,4-D) a concentraciones de 2mg/L para auxinas y 0.2 a 0.5 mg/L para citocininas (Tabla XIV).

Las concentraciones y los reguladores de crecimiento se emplearon, por ser las, de mejor respuesta en otros estudios realizados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la ENCB, donde se han obtenido diferentes tipos de respuesta morfo genética.^{31 y 41}

TABLA XIV. DISEÑO EXPERIMENTAL CON DIFERENTES REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA CONOCER LA RELACIÓN DE AUXINA/CITOCININA.

		AUXINAS				
		2mg/L				
C I T O C I N I N A S	K		AIA	ANA	IBA	2,4-D
		0.2 mg/L	A	B	C	D
	0.5 mg/L	E	F	G	H	
	B A P	0.2 mg/L	I	J	K	L
		0.5 mg/L	M	N	O	P

La concentración de sacarosa en los medios de cultivo fueron de 30g/L, con un pH 5.8 ± 0.1 ajustado con HCl ó NaOH 0.1N. La gelificación se realizó con agar a una concentración de 8 g/L. Se sembraron fragmentos de hoja tallo y raíz a partir de vástagos obtenidos de la reproducción vegetativa de la planta y la planta adulta; así como botón floral (inmaduro) de una inflorescencia.

El segundo experimento consistió en conocer las concentraciones óptimas de la relación de auxina/citocinina que indujeran una mejor respuesta morfogénica. Conocida la relación de auxina/citocinina se procedió de la siguiente manera:

Auxinas

- i) AIA a concentraciones de 0.5, 2.0 y 13.0 mg/L.
- ii) ANA a concentraciones de 0.1, 5.0, y 10.0 mg/L.

Citocininas:

- i) K a concentraciones de 0.5, 1.0 y 10.0 mg/L.
- ii) 6-BAP a concentraciones de 1.0, 3.0 y 5.0 mg/L (Tabla XV).

TABLA XV. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA RELACIÓN AUXINA/CITOCININA QUE INDUZCA UNA RESPUESTA MORFOGENÉTICA.

K mg/L	AIA mg/L			
		0.5	2.0	15.0
0.5	A'	B'	C'	
1.0	D'	E'	F'	
10.0	G'	H'	I'	

6-BAP mg/L	ANA mg/L			
		1.0	5.0	10.0
1.0	J'	K'	L'	
3.0	M'	N'	O'	
5.0	P'	Q'	R'	

Sembrando fragmentos de hoja y tallo de la planta adulta y joven (vástagos obtenidos de la reproducción vegetativa de la planta). En todos los casos, las siembras se realizaron en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar, sometiendo siempre un testigo y/o blanco para evaluar las condiciones óptimas de siembra. El número de inóculos sembrados en cada medio fue de 3 a 4 fragmentos de 1 cm aproximadamente. Sembrando un total de 5 a 6 frascos por medio cultivo diferente.

La primera observación se registró a las 72 horas (tres días) después de la siembra, posteriormente se realizaron observaciones con intervalos de 8, 12, 20 y 28 días con la finalidad de recavar los cambios en el desarrollo del explante, registrando los parámetros cualitativos que se describen en la evaluación del tipo de respuesta.

Se esterilizan los medios de cultivo, agua destilada y material de vidrio, en una autoclave a una presión de 20 lb/pulg² a 120 °C de temperatura durante un período de 20 a 25 minutos. El material no esterilizado se limpia superficialmente con etanol 70%, las pinzas y el bisturí eran flameados con etanol antes de la siembra y en diferentes ocasiones de la misma.

5.6 EVALUACIÓN DEL TIPO DE RESPUESTA

Para evaluar la respuesta morfogenética que provocan los reguladores de crecimiento en diferentes explantes, se tomaron parámetros cualitativos como: a) tipo de respuesta del inóculo, b) color, c) textura, d) forma y e) tamaño.

a) Tipo de respuesta del inóculo empleado.

- 1) No hay respuesta.
- 2) Oxidación del tejido, coloración café oscuro
--Sin crecimiento de tejido--.
- 3) Formación de callo, brotes, raíces o embriones.

b) Del tejido obtenido (callo) se valora.

- i) Textura del tejido: friable o compacto, es decir, si es duro o muy blando al corte del tejido.
- ii) Coloración que puede ser desde crema- amarillento hasta pigmentación verde ó rojizo.⁴⁰

$$\% \text{ Respuesta} = \frac{\text{No. de explantes sembrados con respuesta}}{\text{No. explantes sembrados}} \times 100$$

5.7 CONTROL DE LA OXIDACIÓN

A la par; mientras los métodos de desinfestación estaban a prueba, se realizaron algunos experimentos para controlar la oxidación del tejido. Uno de los experimentos consistió en utilizar un agente antioxidante como: el ácido ascórbico, formando parte de la mezcla de antibiótico-fungicida al 0.1%, antes de la siembra (Tabla XI, XII y XIII).

Otra prueba, fue la de utilizar un antioxidante natural como el jugo de limón, que consistió en: lavar perfectamente con detergente y estropajo el limón, enjuagando con agua corriente y agua destilada. Dentro de la campana de flujo laminar, se asperso con alcohol etílico y se flameó, se cortó a la mitad y con la ayuda de unas pinzas de disección se exprimió cada una de las mitades, colectando el jugo en una caja petrí estéril que contenía aproximadamente 20 mL de agua estéril. Una vez obtenida las solución se procedió de la siguiente manera:

A. Antes de la siembra. Obtenido los explantes en condiciones asépticas se expusieron en dicha solución durante 3 minutos para proceder a la siembra en los diferentes medios de cultivo.

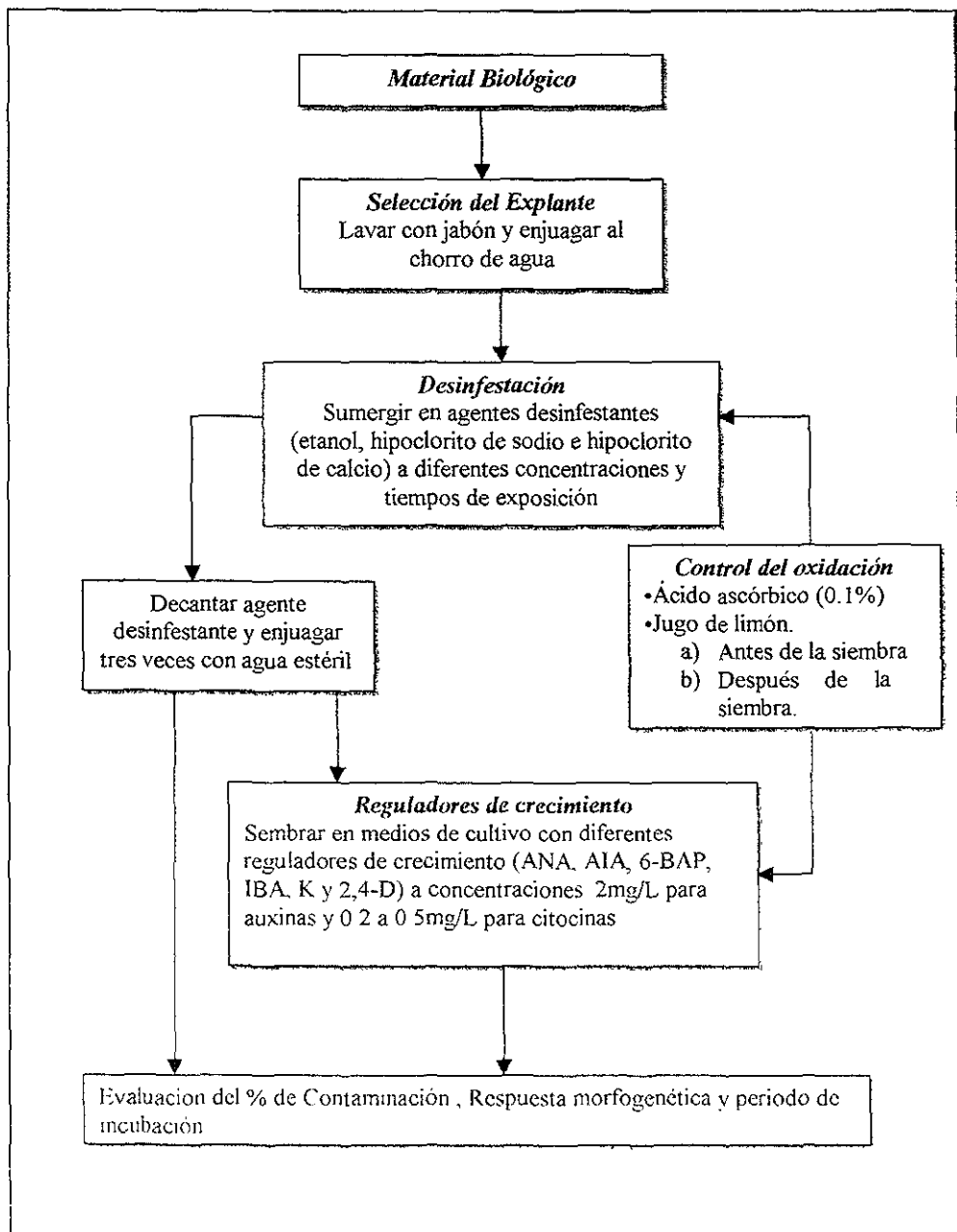
B. Después de la siembra. Este procedimiento se realizó con explantes de un período de incubación de 3 semanas. Los explantes eran enjuagados con agua estéril para eliminar restos del medio del cultivo y posteriormente ser expuestos en la solución.

Fue necesario someter antes un testigo y/o blanco con esta solución para asegurar las condiciones asépticas de manejo; en medios de cultivo sin hormonas de crecimiento que se incubaron durante 3 días y que no mostraron ningún crecimiento pero aseguraron la confiabilidad de la técnica propuesta para el control de la oxidación.

5.8 CONDICIONES DE INCUBACIÓN.

La respuesta del explante con diferentes reguladores de crecimiento y métodos de desinfección, así como control de la oxidación, se valoran en este periodo. Los medios de cultivos fueron incubados a $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, con fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), la iluminación se obtuvo con lámparas fluorescentes de luz blanca de 39 watts colocadas a 25–30 cm de distancia de los cultivos. La temperatura del cuarto de cultivo fue controlada con aire acondicionado. (Diagrama 3)

DIAGRAMA 3. METODOLOGÍA GENERAL PARA EL CULTIVO *in vitro* DE *B. yuccoides*.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 SELECCIÓN DE EXPLANTES

De los explantes sembrados: hoja, tallo, raíz y botón floral (inmaduro) de una inflorescencia la mejor respuesta morfogénica la da el tallo cercano a la raíz. Este tejido por encontrarse totalmente embebido en la tierra originó dar tratamientos de desinfección severos y agresivos.

El tallo con un periodo de incubación de cuatro semanas mostró formación de callo que culminó a las ocho semanas con la presencia de raíz. Pasado este periodo no hubo crecimiento del mismo, el tejido se oxida y muere. Por la sensibilidad del callo y la raíz a la manipulación durante la resiembra.

TABLA XVI. RESPUESTA MORFOGENÉTICA DE DIFERENTES EXPLANTES SEMBRADOS.

<i>EXPLANTE</i>	<i>RESPUESTA (días)</i>			
	<i>8</i>	<i>12</i>	<i>20</i>	<i>28</i>
Hoja	--	--	--	--
Tallo	--	--	--	++
Raíz	--	--	--	--
Botón floral	--	++	++	++

++ Respuesta a la formación de callo

-- Sin ninguna respuesta

En la Tabla XVI se observa que, el botón floral (inmaduro) de una inflorescencia es otro de los explantes que ofrece una respuesta mucho más rápida a la formación de callos (2 semanas). Sin embargo, llegó un periodo en el que no muestra más crecimiento, ni formación de tejido desdiferenciado y la disgregación del callo ocasiona la oxidación y pérdida del tejido, (Tabla XVI). No obstante, una de las desventajas que existe para trabajar este material, es que no se puede contar con él en todo el año, debido a que la planta solo presenta un periodo de florescencia en el mes de abril y el obtener este material implica suprimirse el desarrollo de las semillas que se generan en el mismo botón floral; de manera que son resguardadas y cuidadas valiosamente.

6.2 MÉTODOS DE DESINFESTACIÓN

El hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio son los agentes desinfectantes más utilizados para obtener material aséptico en diversas especies; eliminan, agentes contaminantes del inóculo, instrumental y material que se utiliza durante el cultivo *in vitro*. El tiempo de exposición de ambos agentes son muy variados, porque dependen en gran parte de la sensibilidad de los tejidos para evitar dañarlos o matarlos.

El etanol al 70% se utilizó previo al tratamiento del hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio, para eliminar las grasas de hojas y tallos; permitiendo una mejor penetración del agente desinfectante en el material. Así que se procedió solo, variar las concentraciones y los tiempos de exposición de estos tres agentes desinfectantes (Tablas XI, XII y XIII).

En un periodo de incubación, de 1 a 3 semanas, se observó que la contaminación de los medios de cultivos fue drástica, no sólo por la presencia de hongos, sino por la presencia de una gran carga microbiana, llegándose a contaminar el 100% de los medios de cultivo sembrados (Figura 4). Todos los medios de cultivo presentan altas concentraciones de nutrientes, que los hace susceptibles al desarrollo de diversos microorganismos tanto del medio ambiente como los presentes de la planta misma.

MÉTODO DE DESINFESTACIÓN

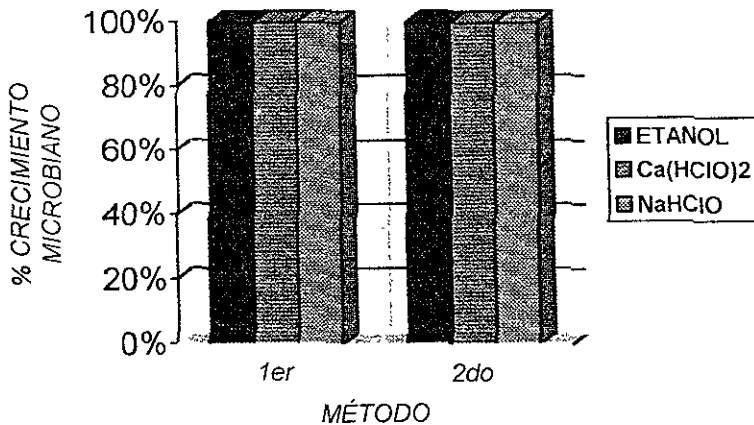


Figura 4. Porcentaje de crecimiento microbiano correspondiente a los dos primeros métodos de desinfección, donde se varía la concentración y el tiempo de exposición del hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio con el material biológico.

Este hecho mostró; que los tratamientos de desinfección no eran los adecuados y que la contaminación microbiana era originada por el mismo inóculo de la planta, debido a que en todos los experimentos se sometió un testigo y/o blanco que, no mostró crecimiento alguno, y que permitió conocer las condiciones óptimas de siembra.

Como el problema de contaminación se presentó en todos los casos de siembra, se optó utilizar una mezcla de antibiótico y fungicida (Tabla X) para controlar la contaminación sistémica. Esta contaminación es la más difícil de eliminar ya que al encontrarse los patógenos en el interior de la planta, no es posible que los tratamientos a nivel superficial eliminen completamente la contaminación; las consecuencias de este tipo de contaminación son más costosas, porque cuando no se detecta se puede creer en un principio que no hay contaminación y esta se expresa después de varias semanas ó cuando se pasa a las etapas de multiplicación, y la pérdida de material es por lo tanto más considerable.

El material biológico fue expuesto a la mezcla, con 24 horas de anticipación a la siembra, para proseguir finalmente, con los tratamientos de desinfestación descritos en las Tablas XI, XII y XIII.

Con los métodos de desinfestación propuestos en estas tablas se observó un control muy efectivo de la carga microbiana y fúngica. El fungicida comercialmente conocido como benomyl presentó una efectividad del 100% con los tres antibióticos de prueba. (Figura 5).

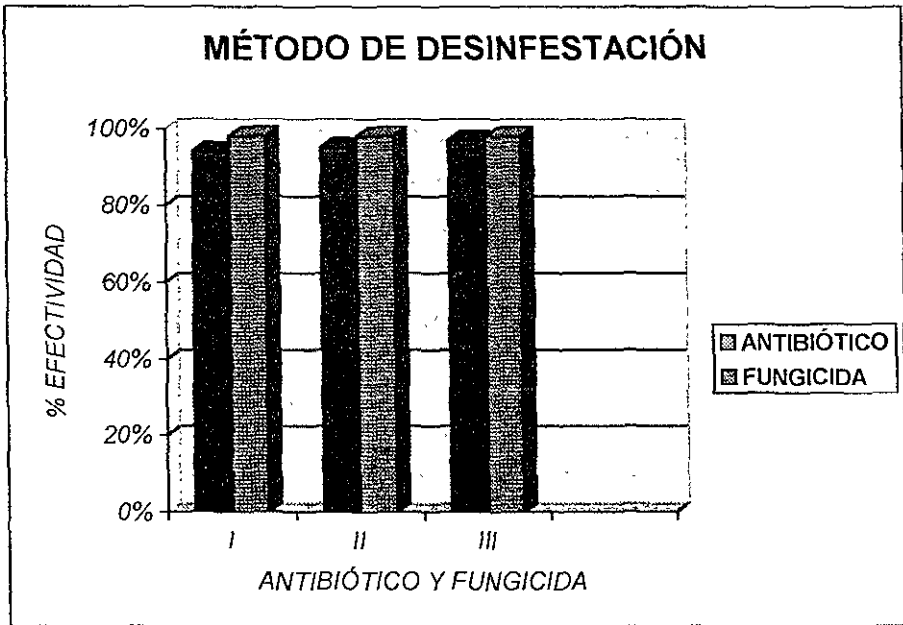


Figura 5. Representación gráfica de la efectividad de la mezcla de antibiótico -fungicida para controlar la contaminación sistémica de la planta.

El antibiótico de mayor efectividad, en un 95% fue la tetraciclina, la efectividad del trimetoprim, sulfametoxazol y gentamicina fue en promedio del 90%, mostrando también disminución de la carga microbiana (Tabla X y Figura 5). En algunos tratamientos fue necesario eliminar agentes de desinfestación para evitar daños posibles al tejido, que provocaran la oxidación y muerte del mismo inóculo, es decir, evitar que los método de desinfestación fueran severos y agresivos.

Los métodos de desinfestación que mejor efectividad mostraron para el botón floral (inmaduro) de una inflorescencia, son los propuestos en la tabla IX dados que son, menos agresivos y severos para el material biológico, ya que se trata de un tejido más delicado y menos expuesto al ambiente.

6.3 REGULADORES DE CRECIMIENTO Y RESPUESTA MORFOGENÉTICA.

Los reguladores de crecimiento, son los compuestos de mayor importancia en la respuesta morfofenética de un explante, encontrar la concentración y la relación de auxina/citocinina es uno de los fines que persigue el Cultivo de Tejidos Vegetales para obtener, propagar y mantener plantas *in vitro* ya que, el mismo ambiente *in vitro* hace que los tejidos tengan comportamientos anormales que se reflejan en desordenes fisiológicos, bioquímicos y morfológicos.

En la primera parte de este desarrollo experimental se observó que el material biológico de mejor respuesta morfofenética fue el botón floral seguido del tallo. Con los tratamientos descritos en la Tabla XVII, el botón floral, presentó mayor respuesta a la relación de AIA/K, tratamientos A y E. En un promedio de 8 a 12 días presentó la formación de un gran callo verdoso.

Sin embargo cuando se disgrega para aumentar el material biológico de trabajo, no presentó crecimiento, ni formación de tejido desdiferenciado, originó con el tiempo la pérdida del tejido. Posiblemente por la propia sensibilidad y viabilidad del callo, a la misma técnica de manipulación que se hace de éste durante la resiembra. La desventaja que se tiene sobre este material, es que sólo se cuenta con el una vez al año, cuando la planta presenta su periodo de florescencia.

En la tabla XVII se muestran los RC con los que, se observó una respuesta por parte del tallo: las auxinas, AIA y ANA, con las citocinina 6-BAP y K (tratamientos A, E, J y N). La respuesta dada fue la formación de callo en un periodo de cuatro meses. No obstante, presentó el mismo problema del botón floral, un periodo de latencia con la disgregación del callo y con esto su muerte. El promedio obtenido en general con estos tratamientos fue del 27% (Figura 6)

En los tratamientos B, F, I y M mostraron también crecimiento, pero en menor porcentaje (8%). En los medios de cultivo restantes, donde sólo se varían las auxinas: IBA y 6-BAP, no presentaron respuesta por parte del tejido (Figura 6).

Es importante mencionar, que a la par fueron probados los métodos tanto de desinfestación, reguladores de crecimiento, así como la misma oxidación, que se hizo presente.

Por lo que en muchos casos la respuesta del tejido pudo verse afectada por los mismos parámetros de control. Por ejemplo, la oxidación no dió el tiempo suficiente para presentar una respuesta por parte del tejido, así mismo los métodos de desinfestación dados, posiblemente indujeran la misma oxidación; y a su vez, los métodos de desinfestación influyeran en la misma respuesta del tejido; dado que se fueron variando por la presencia de la carga microbiana presente en el mismo. Los métodos de control de oxidación aplicados a los explantes, después de un período de incubación, es otro de los factores que posiblemente frenó la respuesta del tejido.

TABLA XVII. RESPUESTA MORFOGENÉTICA A LA FORMACIÓN DE CALLO CON DIFERENTES REGULADORES DE CRECIMIENTO.

		AUXINAS				
		2mg/L				
C I T O C I N I N A S	K	AIA	ANA	IBA	2,4-D	
		0.2 mg/L	A	B	C	D
	6- B A P	0.5 mg/L	E	F	G	H
		0.2 mg/l	I	J	K	L
		0.5 mg.l	M	N	O	P

Formación de callo () Máxima respuesta () Menor respuesta () Sin respuesta ()

RESPUESTA MORFOGENÉTICA

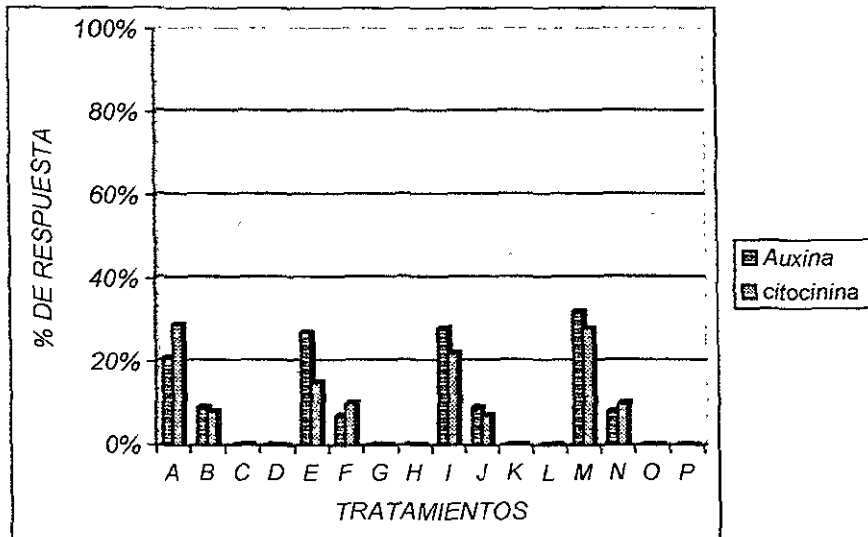


Figura 6. Respuesta morfo-genética de tallo hacia la formación de callo con diferentes reguladores de crecimiento para conocer la mejor relación de auxina/citocinina.

Una vez conocida la relación auxina/citocinina, se procedió a trabajar en el subsecuente experimento con estos reguladores de crecimiento para, encontrar las concentraciones óptimas que, indujeran la formación de callo en menor tiempo o que indujeran a partir de esta respuesta; otra respuesta morfo-genética como: raíces y/o plántula (Tabla XVIII).

TABLA XVIII. RESPUESTA MORFOGENÉTICA A LA FORMACIÓN DE CALLO UNA VEZ CONOCIDA LA RELACIÓN DE AUXINA/CITOCININA.

<i>Botón floral</i>			
AIA (mg/L)			
KINETINA (mg/L)	0.5	2.0	13
	0.5	A'	B' (++)
1.0	D'	E'	F' (+)
10	G' (+-)	H'	I'

<i>Tallo</i>			
ANA (mg/L)			
6-BAP (mg/L)	1.0	5.0	10
	1.0	J'	K'
3.0	M'	N'	O' (++)
5.0	P'	Q'	R'

+- Formación de raíz
+ Formación de callo

El botón floral mostró la formación de un callo verdoso en los tratamientos B, F, y G (Tabla XVIII). En los medios B y G se presentó además del callo, la formación de raíz, que no mostró más crecimiento después de 3 semanas y que al ser sembradas mueren por la propia sensibilidad y viabilidad del tejido. El periodo de respuesta es el mismo mencionado anteriormente de 8 a 12 días solo con la diferencia de la presencia de raíz.

El tallo muestra la formación de callo en casi todos los tratamientos de la relación ANA/6 BAP, sin embargo en el tratamiento L se presenta la formación de raíz a partir del callo. (Tabla XVIII).

6.4 CONTROL DE LA OXIDACIÓN

Conforme transcurrió un periodo de incubación de 3 a 4 semanas, el material biológico de los explantes de tallo presentaron un daño fuerte en su tejido, así mismo el callo formado. El "browning" o ennegrecimiento se hizo presente tanto en el medio de cultivo como en los explantes, que suele concluir con la muerte de los propágulos.

Cuando un tejido cultivado *in vitro*, es separado de sus condiciones naturales, responde a los tratamientos aplicados o situaciones de estrés como: *la desinfestación, el daño mecánico, desecación, cambios de pH*, etc; diferentes de sus condiciones naturales. Si se fragmenta una parte de una planta, los cortes realizados rompen tejido y células, la respuesta natural de la planta es producir sustancias entre las que predominan productos de oxidación, principalmente sustancias fenólicas.

Esta fue la razón de ir eliminado algunos agentes desinfestantes como lo muestran las Tablas XI, XII y XIII, para obtener un material biológico menos dañado y por ende un método de desinfestación propicio.

En general los fenoles son sustancias lábiles y fáciles de oxidar, y los productos de esta oxidación tienen carácter fitotóxico, por lo que son capaces de alterar procesos morfogénéticos de crecimiento y desarrollo, ya que tras su propia oxidación se convierten en potentes oxidantes.

Con base a la experiencia laboral en esta área, se procedió hacer uso de un antioxidante como el ácido ascórbico. El reto era conocer la forma en que el material biológico podría aprovecharlo, sin que tuviera consecuencias en la desinfestación por una posible contaminación del material biológico; al ser aplicado directamente sin una previa esterilización, ya que además, la adición de éste a los medios de cultivo, causaría la degradación del mismo, por el proceso de esterilización.

Así que, se propuso adicionarlo a la mezcla de antibiótico y fungicida 24 horas previo a la siembra. Esta prueba detiene la oxidación del tejido, sin embargo, la mayoría de los explantes no presentaron algún cambio morfogénético en un periodo de dos meses, permaneciendo fuertes hasta que mueren por deshidratación.

La utilización del jugo de limón surgió como una idea de observar que la mayoría de los alimentos que contienen aguacate se les adiciona unas gotas de limón para evitar la oxidación y el ennegrecimiento de éste. Con la exposición de los explantes en la solución de jugo de limón *antes* de la siembra no se observó ninguna respuesta por parte del tejido, los explantes *después* de la siembra igualmente no presentaron respuesta alguna.

De la misma manera aquellos explantes con formación de callo que se sometieron a esta prueba no mostraron más crecimiento y por ende no más la inducción de tejido desdiferenciado. Se genera un periodo de latencia de más de dos meses, hasta que los tejidos mueren por deshidratación. En si los explantes que mostraron formación de callo y raíz fueron aquellos en donde la oxidación no se hizo presente bruscamente.

El botón floral, es el explante que no se somete a ningún control de oxidación, debido a que no presenta este problema.

6.5 CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Una de las partes importantes para el desarrollo de los cultivos *in vitro* son las condiciones de incubación. El ambiente *in vitro* hace que los tejidos tengan comportamientos anormales que se reflejan en desórdenes fisiológicos, bioquímicos y morfológicos en las plantas. Las condiciones de incubación que se manejaron en este experimento, temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo de 16/8 horas de luz/obscuridad, así mismo la iluminación con lámparas fluorescentes de luz blanca de 39 watts colocadas a 25-30 cm de distancia de los cultivos, favorecieron la inducción de una respuesta morfogenética.

Estos parámetros de control son de importancia, se pueden lograr con ellos tasas y niveles de propagación de plantas sanas y de alta calidad *in vitro*, lo cual facilitaría en gran medida su transferencia a condiciones *ex vitro*, con la consecuente disminución de costos de producción."

7. CONCLUSIONES

Se logra el control de la contaminación en el material biológico de *Beschorneria yuccoides* C. Koch. con los métodos de desinfestación, previo al pre-tratamiento de la mezcla de antibiótico y fungicida; se recomiendan aquellos métodos que utilizan un agente desinfestante, para evitar posibles daños del tejido que originen, a la larga otro tipo de problema.

De los diferentes tipos de explante el de mejor respuesta al cultivo *in vitro* son los fragmentos de tallo en presencia de los reguladores de crecimiento vegetal ANA y 6-BAP en concentraciones de 10 mg/L y 3 mg/L respectivamente. Se observa la formación de callos en los medios de cultivo suplementados con estos reguladores de crecimiento después de 4 semanas de incubación, a las 8 semanas se observa la presencia de estructuras radiculares.

En la mayoría de los tratamientos, se observa la oxidación del explante a partir de la cuarta semana e incluso en aquellos que presentaron formación de callo. Se logra el control de la oxidación con la adición de ácido ascórbico a la mezcla de antibiótico-fungicida previo a la siembra; y con la exposición de los inóculos a una solución de jugo de limón antes y después de la siembra. Mostrando ser más efectivo el tratamiento con el jugo de limón. Sin embargo es conveniente conocer la concentración más adecuada de esta solución que, permita el desarrollo del explante y el crecimiento del callo.

Cuando los cultivos se mantienen por tiempos prolongados mayores de 3 meses, es más complicado mantener los tejidos vivos, aún con diferentes resiembras a medios frescos: por la propia sensibilidad que presentan a la técnica de manipulación. Es recomendable, hacer uso de una técnica de manipulación que permita incrementar el material biológico de trabajo, sin exponer el material a condiciones drásticas de estrés como son: corte, deshidratación, manejo, pH, etc.

El explante que no presenta problemas de oxidación y contaminación, es el botón floral (inmaduro) de una inflorescencia, ofrece una mayor respuesta, en un periodo de 8 a 12 días con formación de callo y raíces, a diferentes concentraciones de ALA/K. El trabajar con este material biológico sería lo más idóneo, por las múltiples ventajas que ofrece. A un futuro nos permitiría conocer, si existe en este tejido, una pronta respuesta a la formación de plántula, así mismo, también, si en él existe, una mayor producción del metabolito de interés (saponina) con relación al tallo, una vez establecidos los medios en suspensión.

8. PROPUESTAS

Este trabajo proporciona las bases de Cultivo de Tejidos para continuar con pruebas a nivel laboratorio, del análisis de metabolitos secundarios (Saponinas) en cultivos en suspensión, comparando el rendimiento con relación al producido por la planta en condiciones naturales, para posteriormente trabajar con los factores que permitan el incremento del metabolito, y así poder plantear su escalamiento a planta piloto e industrial.

Debido a que en este experimento la mayor parte del tiempo se trabajó con los métodos de desinfestación y reguladores de crecimiento. Se recomienda, que se lleve a cabo, un estudio más profundo, donde se modifiquen las condiciones de incubación como son: temperatura y fotoperiodo, para inducir una pronta respuesta morfogénica del explante; ya que es uno, de los factores más importantes para el desarrollo de los cultivos *in vitro*.

En el Cultivo de Tejidos Vegetales, debe considerarse de *manera íntegra*, los factores más importantes que controlan la respuesta *in vitro*, como son: selección del explante, método de desinfestación, adición de antioxidantes, tipo de reguladores de crecimiento y condiciones de incubación. Estos factores se involucran en la respuesta morfogénica de un tejido para obtener, propagar y mantener plantas *in vitro*.

La biotecnología vegetal en México, tiene gran potencial y ofrece numerosas expectativas, pero es importante que en su desarrollo, exista un equilibrio entre el interés comercial y los aspectos sociales y educativos, estos últimos fundamentales en la sociedad contemporánea.

En este campo del quehacer científico, se requiere además, intensificar la formación de recursos humanos altamente capacitados, con una conciencia de protección de nuestros germoplasmas y ecosistemas. Es decir de valoración y cuidado de los recursos vegetales que son diversos y muy valiosos.

9. REFERENCIAS

1. Villegas M. Boletín del laboratorio de Etnobotánica. ENCB (IPN). 1991; 31-3.
2. García MA. Monografía del género *Beschorneria* kunth *Agavaceae*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias. UNAM, México. 1987; 9-16.
3. García MA y Galván VR. Riqueza de las familias *Agavaceae* y *Nolinaceae* en México. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 1995; (56): 7-24.
4. Villegas M, Rico L, Silva R, Castillo L. Estudio Etnobotánico, Microbiológico, Fitoquímico, Biotecnológico y Edafológico de *Beschorneria yuccoides* C. Koch (*Agavaceae*), especie en peligro de extinción. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 1996; 27(6): 23-6.
5. Brunetón J. Elementos de fitoquímica y farmacognosía. Edit. Acribia, España. 1991; 305-9.
6. Villegas GT. La biotecnología Vegetal y su importancia para el México moderno. Ciencia, Arte: IPN Cultura. 1997; (11): 42-5.
7. Maldonado TY. La biotecnología y la preservación ecológica. La Jornada Ecológica. 1996; 5(50): 22-8
8. Paredes LO. La Biotecnología de plantas una herramienta estratégica en los programas agroalimentarios de México. Ciencia y Desarrollo. 1986; 12(3): 87-91.
9. Peña G, Rico L, Pérez K y Villegas T. La descentralización de la investigación. Ciencia, Arte: IPN Cultura. 1998; 19(4): 19-21.
10. Scagel RF. Vegetación en México. Edit. Limusa. México, 1980; 281-313
11. Granada CL. Propagación *in vitro* de *Dioscorea composita* Hemsl Tesis de licenciatura. UACH, México. 1980; 1-26.

12. Bolívar ZF. Biotecnología moderna en México: Áreas estratégicas, Biotecnología moderna en México. Edit. Continental, 2nd ed. España. 1993; 43-82.
13. Bautista ML. Propagación masiva de coníferas por cultivo de tejidos. Ensayo Bibliográfico. ENCB (IPN), México. 1993; 55-9.
14. Hurtado VD y Merino M E. Cultivo de Tejidos Vegetales. Edit. Trillas, México. 1987; 44-92.
15. Lindsey K y Jone C. Biotecnología Vegetal Agrícola. Edit. Acribia, España. 1992; 63-85.
16. Hartmann TH. Propagación de plantas, principios y practicas. Edit. Continental, México. 1995; 593-609.
17. Vidalie I, Snaker V y Roussandt E. Cultivo *in vitro*. Edit. Científica, México. 1986; 109.
18. Azuala EA. Papel de los reguladores del crecimiento vegetal en el cultivo de tejidos *in vitro*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México. 1972; 129.
19. Linasav W. Biotechnonology: Challenges for the flavors and food industrial Elsevier Science Publishers, Inglaterra. 1987; 210-2.
20. Chávez MM. Cultivo *in vitro* de algunas especies vegetales para al obtención de colorantes naturales (Betalainas). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México. 1991; 79.
21. Karnoky DF. Potencial for forest threer Improvement: via tissue culture. Bio-science. 1981; 31(4): 114-9.
22. Wareing PF. Determination in plant cell. Physiology plant. 1991; 23(9): 1-10.
23. Margara J. Bases de la multiplicación Vegetativa. Edit. INRA, París Francia. 1982; 188-230.

24. Vásil IK. Cell culture and somatic cell genetics of plants. Edit. Academic Press, inc. Orlando, Florida, USA. 1984; 825.
25. Paredes LO. Pasado, presente y futuro de la biotecnología. Ciencia y Desarrollo. 1993; 9(7):10-12.
26. Brodelías P. Increasing secondary metabolite production in plant-cell culture by redirecting transport. Plant Science. 1993; 11(52): 195-201.
27. Rzedowski I. La Biodiversidad de México. Edit. Limusa, México. 1978; 281-313.
28. Berlín PJ. Formation of secondary metabolites in cultured plant cells and its impact on pharmacy biotechnology in agriculture and forestry. Plant Science. 1998; (4): 37-55.
29. Roades MJ. Review Physiological roles for secondary metabolites in plants some progress, many outstanding problems. Plant Molecular Biology. 1994; 24(8): 87-92.
30. Prerik RL. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi-Prensa, España. 1990; 29-34.
31. Flores H. Secondary metabolites from root cultures. Tibtech. 1987; 5:125-8.
32. Dougall D. Factors affecting the yields of sessecondary products in tissue cultures. Plant Cell and Culture. University Press. Ohio State, USA. 1989; 727-9.
33. Peña G, Rico L, Pérez K y Villegas T. Biotecnología Vegetal: Una alternativa en la producción de sustancias de interés industrial. Ciencia, Arte: IPN Cultura. 1998; 19(4): 25-8.
34. Medina GI. Perspectivas de la Biotecnología en México. Rev. Instr. Ing. Quim. 1987; 2 (29): 14-9.
35. Tapía CA. Estudio fitoquímico y actividad fungicida de *B. yuccoides* C. Koch Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", UNAM. México. 1990: 54-83.

36. Pavel K, Valetin A, Babeyka P y Stepan A. Beschornin and Beschorside, steroidal Saponins of *Beschorneria yuccoides*. *Phytochemistry*. 1982; 21(6): 1447-9.
37. Domínguez XA. Métodos de investigación fitoquímica. Edit. Limusa, México. 1979; 39-44.
38. Grayer RJ y Harborne JB. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry*. 1994; 37(1):19-42.
39. Navarrete CA. Estudios Químicos de las plantas medicinales usadas en medicina tradicional. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM, México. 1986; 9-25.
40. López PC y Sánchez CI. Cultivo aséptico e inducción de callos a partir de acículas de pino. III Congreso de Biotecnología y Bioingeniería. Monterrey N.L. México. 1991; 10-14.
41. Aguilar MI. Utilización de Tejidos Vegetales para la obtención de Digoxina y Digitoxina. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México. 1987; 45-60.
42. Murashige T and Skoog. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physical plant*. 1962; (15); 473-497.
43. Garner G y Kende H. Hormone binding in plants. *Ann. Plant Physiology*. 1986; (27): 267-290.

ANEXO I

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MEDIOS BASAL
DE MURASHIGE Y SKOOG (1962).

<i>Componentes</i>	<i>Concentración media Final (mg/L)</i>	<i>Peso/2 Litros</i>
<u>MS Mayor</u>		
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	7.400g
NH ₄ NO ₃	1650.0	33.000g
KNO ₃	1900.0	38.000g
KH ₂ PO ₄	170.0	3.400g
<u>MS Menor</u>		
H ₃ BO ₃	6.2	0.124g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.5	0.172g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.500mg
KI	0.88	17.600mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.500mg
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25	5.000mg
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9	0.338g
<u>MS Vitaminas</u>		
Glicina	2.0	40.000mg
Ácido Nicótimco	0.5	10.000mg
Piridoxina HCl	0.5	10.000mg
Tiamina HCl	1.0	20.000mg
Mio-mositol	100	2.000g

ANEXO II

COMPOSICIÓN QUÍMICA TOTAL DE LOS MEDIOS DE CULTIVO
EMPLADOS EN ESTE EXPERIMENTO

MS BASAL	
COMPONENTES	CANTIDAD POR LITRO
MS Mayor	100 mL
Ms Menor	100 mL
Ms Vitaminas	100 mL
Fe. EDTA	10 mL
CaCl ₂ .H ₂ O	10 mL
Sacarosa	30 g
Aforar a 1L y pH 5.8 ± 0.1 Agar 8g/ L	

FeSO₄.7H₂O 1.39gCalentar separadamente
Combinar y disolver en
500 mL.Na₂ EDTA 1.865gESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

GLOSARIO

- allo:** Masa amorfa de células.
- diferenciación:** Proceso de formación de tejidos y órganos diversos a partir de masa iniciales de células embrionarias idénticas.
- diploide:** Célula portadora de una doble dotación de material genético, la mitad de origen paterno y la otra mitad de origen materno, pudiéndose agrupar los cromosomas en "n" parejas de homólogos (cada miembro de un progenitor) de donde se acostumbra a simbolizar esta dotación diploide por $2n$.
- longación:** Alargamiento o aumento longitudinal de una célula o tejido.
- embriogénesis:** Conjunto de procesos que conducen a la formación y desarrollo de un embrión, desde la fecundación de las células sexuales.
- explante:** Tejido seccionado de una planta, cultivado en medios de crecimiento artificiales, con fines experimentales.
- haploide:** Posesión de la mitad de la dotación cromosómica diploide.
- Meristemo:** Tejidos vegetales responsables del crecimiento de la planta en longitud y en grosor, caracterizado porque sus células conservan indefinidamente la propiedad de dividirse, comportándose como un tejido embrionario.
- Morfogenético:** Proceso por el que cada órgano de un individuo va diferenciándose de los demás en el curso del crecimiento, adquiriendo la forma, estructura y restantes caracteres que le son propios.

- Plántula:** Planta joven nacida de una semilla o de tejido indiferenciado.
- Propágulo:** Órgano o parte de un vegetal.
- Organogénesis:** Conjunto de procesos dentro del desarrollo embrionario, que conducen a la aparición y formación de los distintos órganos en los seres.
- Senescencia:** Estudio de los cambios biológicos relacionados con el envejecimiento, en especial relieve en plantas y animales.
- Somático:** Se emplea en contraposición a germinal o sexual cuando se refiere a las células de un organismo. En este sentido, se refiere a las células que no participan en el proceso de reproducción (células diploides) al contrario de las células sexuales (células haploides).
- Vástago:** La parte aérea de la planta, la cual incluye tallo , ramas y hojas.