



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

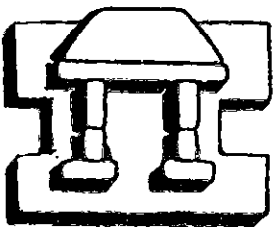
DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA RADICULAR Y EN LA PRODUCCION DE PEROXIDASAS DEL RABANO PICANTE (Armoracia lapathifolia (Gilib) EN DOS MEDIOS DE CULTIVO.

T E S I S QUE PRESENTA: NORMA GONZALEZ SANCHEZ PARA OBTENER EL TITULO DE: B I O L O G A

Director de Tesis:

BIOL. MARCIAL GARCIA PINEDA

Jardín Botánico - Invernadero



IZTACALA

Los Reyes Iztacala, Edo. de México

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.

Señor:

Gracias por la vida que me has otorgado, por que gracias a ella puedo maravillarme con cada conocimiento que adquiero de tú magnífica creación.

A mis padres: Concepción y Lucas.

A mis hermanos: Eduardo y Héctor, por su ejemplo y consejo.

A mis tías: Guillermina y Yazmín, por su apoyo y presencia.

A mis primas: Claudia, Berenice y Yazmín, por su interés en todos mis proyectos y trabajos.

A mi querido y amado Noé

Les dedico éste trabajo.

Agradezco a:

A mi asesor:

Biol. Marcial García Pineda, por el tiempo dedicado a éste trabajo y por los comentarios realizados.

A mis sinodales:

Biol. Héctor Barrera Escorcía.

Biol. Antonio Meyran Camacho.

Dr. Sergio Vaca Pacheco.

M. en C. Ma. del Socorro Sánchez Correa.

Por sus atenciones y comentarios.

Al maestro Gerardo Ortiz por sus valiosas aportaciones.

Al Dr. Ernesto Aguirre, por su orientación.

A la maestra Tere García Castañeda.

Por su amistad, consejo, ayuda, confianza y formación. Y por permitirme trabajar en su laboratorio los aspectos químicos.

A la M. en C. Margarita I. Garrido. Por tú amistad, y ayuda invaluable.

A la M. en C. Verónica Garrocho. Por enseñarme a ver las dificultades de una forma positiva y por brindarme tú amistad.

A la Ing. Belem Rangel. Por ser una amiga justa e inteligente, y por tus palabras de apoyo.

## INDICE GENERAL

RESUMEN . . . . .	1
I.- INTRODUCCIÓN. . . . .	1
II.- ANTECEDENTES. . . . .	4
2.1.- La biotecnología y sus diferentes áreas. . . . .	4
2.2.-Cultivo de tejidos vegetales. . . . .	4
2.2.1.- Propagación de plantas "in vitro". . . . .	4
2.2.2.- Producción de metabolitos vegetales. . . . .	5
2.2.3.- Transformación de ADN recombinante. . . . .	6
2.3.- Armoracia lapathifolia (Gilibert) y su importancia. . . . .	6
2.3.1.- Clasificación taxonómica y descripción. . . . .	6
2.3.2.- Historia. . . . .	8
2.3.3.- Importancia económica. . . . .	8
2.4.- Producción de enzimas vegetales. . . . .	9
2.4.1.- Selección de plantas para la producción de enzimas. . . . .	9
2.5.- Las peroxidasas . . . . .	10
Importancia económica. . . . .	10
Análisis químico. . . . .	11
Análisis inmunoenzimático. . . . .	12
Importancia en la fisiología vegetal. . . . .	12
2.5.2.- Aplicaciones. . . . .	13
Tratamiento de aguas residuales. . . . .	13
Estudios moleculares y genético. . . . .	13

III.-OBJETIVOS. . . . .	14
3.1.- Objetivo general. . . . .	14
3.2.- Objetivos particulares. . . . .	14
IV.- MATERIAL Y MÉTODO. . . . .	15
4.1.- Selección del material vegetal. . . . .	15
4.2.- Inóculo . . . . .	15
4.3.- Medios de cultivo. . . . .	16
4.4.- Condiciones de incubación. . . . .	17
4.5.- Obtención del extracto crudo. . . . .	17
4.6.- Determinación de la actividad de peroxidasa. (Rao,1995). . . . .	18
4.7.- Determinación del mejor cultivo. . . . .	18
V.-RESULTADOS. . . . .	19
5.1.- Confirmación de la transformación. . . . .	19
5.2.- Respuesta de los diferentes inóculos en cultivo de tejidos. . . . .	20
Porcentaje de respuesta del inóculo. . . . .	20
5.3.- Resultados estadísticos.	
Número de raíces de Rábano comercial joven con fotoperiodo. . . . .	21
Longitud de raíces de Rábano comercial joven con fotoperiodo. . . . .	22
Diámetro de raíces de Rábano comercial joven con fotoperiodo. . . . .	23
Número de raíces de Rábano transgénico joven con fotoperiodo. . . . .	24
Longitud de raíces de Rábano transgénico joven con fotoperiodo. . . . .	25
Diámetro de raíces de Rábano transgénico joven con fotoperiodo. . . . .	26
Número de raíces jóvenes de Rábano comercial sin fotoperiodo. . . . .	27
Longitud de raíces jóvenes de Rábano comercial sin fotoperiodo. . . . .	28
Diámetro de raíces jóvenes de Rábano comercial sin fotoperiodo. . . . .	29
Número de raíces viejas de Rábano comercial sin fotoperiodo. . . . .	30
Longitud de raíces viejas de Rábano comercial sin fotoperiodo. . . . .	31
Diámetro de raíces viejas de Rábano comercial sin fotoperiodo. . . . .	32
Número de raíces jóvenes de Rábano transgénico sin fotoperiodo.. . . .	33
Longitud de raíces jóvenes de Rábano transgénico sin fotoperiodo. . . . .	34
Diámetro de raíces jóvenes de Rábano transgénico sin fotoperiodo. . . . .	35

Número de raíces viejas de Rábano transgénico sin fotoperiodo. . . . .	36
Longitud de raíces viejas de Rábano transgénico sin fotoperiodo. . . . .	37
Diámetro de raíces viejas de Rábano transgénico sin fotoperiodo. . . . .	38
5.4.- Actividad de las peroxidasas. . . . .	39
Actividades de las enzimas peroxidasas para el rábano comercial. . . . .	39
Actividades de las enzimas peroxidasas para el rábano transgénico. . . . .	40
VI.- ANÁLISIS. . . . .	41
Respuesta de los diferentes inóculos. . . . .	41
Actividad de peroxidasas. . . . .	44
VII.- CONCLUSIÓN. . . . .	45
VIII.-RECOMENDACIONES. . . . .	46
IX.- APENDICE. . . . .	47
X.- BIBLIOGRAFÍA.. . . .	51

## RESUMEN

*Armoracia lapathifolia* es uno de los dos géneros de cuya raíz se extraen las enzimas peroxidasas de una forma comercial. Las peroxidasas tienen la siguiente clasificación internacional E. C. 1.11.1.7. donador: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa, POD; siendo una gran familia de isoenzimas que se encuentran fundamentalmente en todas las plantas superiores. Debido a los requerimientos de infraestructura y materia prima, que representa la extracción por métodos tradicionales de los metabolitos vegetales, se ha pensado en la biotecnología vegetal, específicamente en el método de cultivo de tejidos vegetales para la micropropagación del rábano, para de ésta forma producir el metabolito de interés, que en este caso fueron las enzimas peroxidasas.

Se trabajó con dos cultivos: rábano comercial, y rábano transgénico; ambos en estado joven (8 semanas) y viejo (de más de 6 meses), a los cuales se les aplicaron tratamientos con fotoperiodo y sin fotoperiodo, en dos medios de cultivo el de Murashige y Skoog (MS) y el de tuberización.

Las variables cuantificadas para determinar al mejor sistema de cultivo fueron: Número, longitud y diámetro radicular, los datos obtenidos se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de varianza. Posteriormente se realizó la medición de la actividad enzimática de las peroxidasas.

Los mejores medios de propagación para ambos cultivos fueron el medio MS líquido y el medio de tuberización líquido. El cultivo que tuvo mayor producción de peroxidasas totales fue el rábano transgénico joven en un medio de tuberización líquido.



## I.- INTRODUCCIÓN

Armoracia lapathifolia nombre científico del comúnmente llamado rábano picante ó rábano blanco del Japón, es uno de los vegetales que tiene un uso múltiple en la sociedad actual, ya que se ha empleado desde tiempos remotos, utilizándose toda la planta de la hoja hasta la raíz.

A esta planta se le han dado diversos usos como son: El consumo como condimento de rábano verde en el sushi, también se utiliza por su sabor fuerte parecido al de la mostaza, que le confiere un característico sabor picante por lo que se le da el nombre de rábano picante, este sabor lo adquiere por un compuesto azufrado de las raíces ralladas, que al ser mezclado con vinagre, aceite o mayonesa es consumido como condimento principalmente en los países Europeos (Shamel, 1999).

La raíz del género Armoracia tiene una gran importancia ya que es empleada para extraer metabolitos primarios como son las enzimas peroxidasas, ó secundarios como el isotiocinato de etilo ( $C_3H_5CNS$ ), los cuales son empleados en la industria de los alimentos así como en la farmacéutica, entre otras (Font Quer, 1973).

La obtención comercial de metabolitos se realiza principalmente mediante el procesamiento de la planta completa. La manufactura de tales compuestos tiene asociados numerosos problemas, como son los suministros de materia prima los cuales pueden tener gran variación debido a los cambios ambientales, por tal motivo se necesita una cantidad muy grande de materia prima, por ejemplo para extraer 100 Kg de teobromina se necesitan 12 toneladas de cascarilla de cacao y una fuerza de trabajo de 220 horas (Schwyzer, 1946). En el caso del rábano se requieren 10 millones 896 mil kg de raíz para producir 22 mil litros de condimento anualmente en E. U. A. (Silverspringgardens, 2001), en este tipo de extracción industrial, la obtención máxima del producto es relativamente fija y difícil de mejorar. Estos problemas son conocidos desde hace tiempo, por ello se ha propuesto como alternativa el cultivo de tejidos vegetales (Loyola 1985) ya que esta técnica tiene como objetivo básico la producción rápida a gran escala de individuos genéticamente idénticos al individuo de partida y perfectamente sanos (Bu'Loock, 1991).

Por esta razón se encuentra una tendencia de investigación, dirigida a la producción de metabolitos vegetales a partir de cultivo de tejidos in vitro (Taylor, 1998), esto con el fin de optimizar las velocidades de crecimiento por medio de la reformulación de medios de cultivo y la modificación de las condiciones ambientales como son: la luz, la temperatura, la oxigenación del medio, la magnitud del ciclo de crecimiento, así como las condiciones atmosféricas (Loyola 1985).

Dentro de los metabolitos vegetales de interés se encuentran las enzimas, de las cuales durante muchos años se han hecho preparaciones rudimentarias. Sin embargo, la extracción industrial de enzimas a partir de plantas es a menudo difícil y requiere equipo pesado para macerar y moler el material típicamente fibroso. Los sistemas de molienda comunes por lo general son insuficientes, excepto en los casos donde la fuente de materia es el tejido de las

hojas y es posible usar molinos de martillo de uso rudo modificados, este tipo de molinos requiere de un espacio aislado con características específicas (Schwyzer, op cit). Por la infraestructura y el costo que esto representa se ha pensado como alternativa de producción, a la biotecnología vegetal, en particular al cultivo de tejidos vegetales.

Esta técnica aporta una ventaja en la extracción de enzimas ya que por medio de cultivo de células y órganos como raíces, es posible mantener cultivos de propagación masiva o en biorreactores (Quintero, 1993), en donde se puede cosechar continuamente las células o los órganos para la extracción, usando sistemas de transporte activo, siendo estos más fáciles de manejar ya que son menos fibrosos que los tejidos cultivados tradicionalmente, otra ventaja de el cultivo de tejidos vegetales es que, se pueden producir enzimas que se secreten al medio haciendo una extracción más eficiente del metabolito de interés por medio de biorreactores (Taylor, 1998; Jiménez, 1996). Sin embargo para desarrollar el cultivo en biorreactores, se requiere de la optimización del material biológico, del medio de cultivo, y del sistema del biorreactor (Payne, 1992) para así poder tener una buena producción del metabolito de interés.

Parte de este trabajo está dedicado a la producción de las enzimas peroxidasas, ya que éstas son utilizadas para diversas actividades, como: en la industria de los alimentos, en diferentes análisis químicos e inmunológicos (Nakane, 1974), en la fisiología celular, en bioquímica, y en el manejo de aguas residuales (Henry, 1974, Klibanou et al.1983), entre otros.

Las peroxidasas pertenecen a una gran familia, de glicoproteínas que contienen un grupo hemo en el sitio activo teniendo la función primaria de oxidar compuestos a expensas de peróxido de hidrógeno. Se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas superiores donde se pueden encontrar una gran variedad de isoenzimas originadas por el efecto de la diversidad genética, modificaciones postraduccionales (Prado, 1999).

En cultivo de tejidos vegetales se han realizados estudios diversos para producir peroxidasas en una forma biotecnológica, empleando diversos inóculos como son: el cultivo de callos, el cultivo de células y el cultivo de raíces principalmente.

Por la importancia que representa la especie Armoracia lapathifolia se han desarrollado diversos grupos de investigación en los que encontramos a Uozumi y colaboradores (1994) quienes se dedican a la micropropagación vegetal y producción de líneas altamente productoras de peroxidasas, así como Taya et. al. en 1989, que se dedicaron a la transformación del material genético, transformando las raíces (hairy roots), que son transformaciones inducidas por infección con Agrobacterium rhizogenes, estas raíces pueden tener proliferación activa con fenotipos estables y son productores prometedores de metabolitos útiles (Repunte, et al 1993), otra línea es representada por Host et al en 1998 y Shahangian et al en 1982 entre otros, quienes se han preocupado por estudiar la caracterización y separación de las isoenzimas presentes en los extractos vegetales, hay también varios grupos que han desarrollado diversas formas de cuantificación enzimática (Kuo y Frodouschi, 1988; Kuan et al 1993).

Existen innumerables trabajos sobre peroxidasas vegetales, simplemente en la década comprendida entre 1970 y 1980 se publicaron 1488 trabajos, y para la siguiente década (1980-1990) el número de trabajos se triplica a 3293, para los noventas la producción de trabajos sigue aumentando y se crean publicaciones especializadas y el simposio internacional de peroxidasa vegetales que se realiza cada tres años iniciando en Dinamarca en 1993. Los trabajos son principalmente de aspectos fisiológicos, propiedades cinéticas, aprovechamiento industrial y sus aplicaciones analíticas. (Lobarzewski 1995)

## II.- ANTECEDENTES

### 2.1.- La biotecnología vegetal y sus diferentes áreas.

La biotecnología vegetal es una técnica importante ya que utiliza agentes biológicos, sistemas o materiales para producir bienes y servicios para el mercado, industria o comercio (Scragg, 1996). A partir de esta definición podemos dividir a la biotecnología vegetal en cuatro áreas principales :

- 1.- Bioprocesos. Que incluyen la fermentación como medio para producir vinos; pan y productos farmacéuticos.
- 2.- Cultivo de tejidos. El cual comprende el cultivo de partes de plantas "*in vitro*" para su uso en propagación, control de agentes patógenos, conservación de germoplasma, selección de plantas con medios específicos de cultivo o para la inducción de variabilidad genética.
- 3.- Inmunología. Que incluye el uso de anticuerpos para la detección de agentes causales de enfermedades en plantas.
- 4.- Ingeniería genética. Que a través del fitomejoramiento clásico del uso de DNA recombinante, marcadores moleculares y otras técnicas relacionadas permiten la identificación, aislamiento, modificación, transferencia y expresión de genes de un organismo a otro, (Cortinas, 1997).

### 2.2.- Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales es una área de la biotecnología que tiene como objetivo básico la multiplicación asexual, rápida y a gran escala, de individuos genéticamente idénticos al individuo de partida (clones), perfectamente sanos, (Ducreux, 1984) en condiciones asépticas y controladas, (Alferman, 1995).

En la actualidad las propiedades únicas de regeneración de las plantas y su potencial bioquímico se utilizan esencialmente en 3 vertientes: Propagación de plantas "*in vitro*", producción de metabolitos vegetales y la utilización de ADN recombinante.

#### 2.2.1.- Propagación de plantas *in vitro*.

Es una micropropagación que utiliza técnicas de cultivo de órganos (ápices, yemas, meristemos, raíces, etc.), tejidos (parénquima, colénquima, callos, etc.), (Brown, 1989) y células (protoplastos, microsporas u óvulos) para lograr la multiplicación masiva e ilimitada de plantas (Webb, 1987); ésta técnica se lleva a cabo mediante la fragmentación del tejido el cual posteriormente genera plantas completas de estos fragmentos, éstos procesos se realizan en condiciones artificiales y controladas (Lozoya, 1985), lo que favorece la producción de organismos vegetales modelo, para estudios fisiológicos, bioquímicos y genéticos, además se pueden obtener plantas libres de agentes patógenos. Este método ha

sido ampliamente utilizado en un gran número de especies de plantas, como las hortalizas (del orden cruciales al que pertenece el género *Armoracia lapathifolia*.), las plantas de ornato, cereales, y de importancia forestal (Webb, op cit.).

La propagación vegetal consta de las siguientes fases de micropropagación:

**Fase 0.** - Es el precultivo de materiales parentales, aquí se da la preparación de la planta madre o de los inóculos, para disminuir los niveles de contaminación por microorganismos y se preparan los tejidos para una multiplicación más eficiente.

**Fase I.** - Es el establecimiento o iniciación de cultivos asépticos, que debe considerar los siguientes puntos: Desinfección, corte e incubación de los inóculos, debe vigilarse continuamente la contaminación para evitar problemas en las fases subsecuentes.

**Fase II.** - Es donde se da la multiplicación por medio de: inducción de brotes axiales, brotes adventicios, embriones somáticos directos o indirectos, producción de callos y organogénesis.

**Fase III.** - Es el enraizamiento y preadaptación de microcortes "in vitro".

**Fase IV.** - Trasplante a tierra y adaptación de microcortes o de plántulas previamente enraizadas, se pueden transferir a mezclas de suelo o a sustratos artificiales, que se encuentren en cuartos de crecimiento o invernaderos (Murashige, 1974. Lechuga, 1994).

### 2.2.2.- Producción de metabolitos vegetales.

Todas las plantas producen sustancias naturales. Muchas de ellas, acumulan sustancias en cantidades lo suficientemente altas, para ser utilizadas como fuentes de compuestos químicos económicamente importantes. Estas sustancias generalmente son clasificadas como metabolitos primarios o secundarios. Los metabolitos primarios son sustancias de amplia distribución en la naturaleza y se encuentran en la mayoría de los organismos. Los metabolitos secundarios, son sustancias que se derivan biosintéticamente de los componentes del metabolismo primario (Arellano, 1995).

#### Obtención de los metabolitos vegetales.

La obtención comercial de los metabolitos vegetales se realiza mediante la extracción apartir de plantas completas. Pero la manufactura de tales compuestos tiene asociados, numerosos problemas como son, los suministros de la materia prima que pueden ser erráticos debido a calamidades naturales, tales como variaciones del clima, por ejemplo en México la sequía es la responsable de la pérdida anual del 30 % de la cosecha del maíz, o a la pérdida de los cultivos debido a las plagas, donde se tienen pérdidas superiores a 2500 millones de dólares anuales (Cortinas, 1997). Una sola plaga, la de chapulín alcanza a perjudicar a 16 estados en la Republica Mexicana en una temporada, causando la pérdida de más de tres mil hectáreas tan solo en el estado de Zacatecas ( Amador, 2000). Además, la obtención máxima de producto es relativamente fija y difícil de mejorar. Estos problemas son conocidos desde hace tiempo; por ello se ha pensado en la biotecnología vegetal como una buena alternativa de producción, de metabolitos vegetales (Loyola, 1985).

El cultivo de tejidos vegetales puede ser por sus características, un sistema de suministro continuo y homogéneo de sustancias naturales, ya que se pueden mantener y manipular a los inóculos vegetales, en una etapa de su desarrollo fisiológico, lo cual dará un cultivo uniforme debido a las condiciones controladas, a demás, que los cultivos en suspensión se pueden manipular de manera análoga a los procesos tradicionales de fermentación (Loyola, 1985), a partir de masas celulares (Brown, 1989), o de células en biorreactores para la biotransformación de productos (Stückigt, 1995).

### 2.2.3. - Transformación de ADN recombinante.

El ADN se utiliza para modificar genéticamente a las plantas en particular en cultivos agrícolas (Brown, 1989). La transformación genética es la penetración de nuevo material genético a una célula y su integración y expresión en el genoma de esta.

Estos estudios han contribuido al fitomejoramiento, al desarrollar diversas variedades de plantas transgénicas para resistir enfermedades, ataques por insectos y herbicidas (Cortinas, 1997).

Otra aplicación se encuentra en la creación de alimentos vegetales con un mejor procesamiento y/ o características nutricionales; en 1992 la Monsanto Company logró insertar exitosamente un gen en la papa Russet Burbank, que incrementó el contenido de almidón y redujo la absorción de aceite durante el freido, así como el contenido de aceite en el producto terminado.

Y en 1994 la administración de alimentos y fármacos de los Estados Unidos (por sus siglas en ingles FDA) permitió la comercialización de varios productos enteros entre los que se encuentra el jitomate de lenta maduración Flaur Saur, al cual se le desactivo el gen para la poligalacturonasa, que es la enzima responsable del ablandamiento (Brewer, 1999).

Pero no solamente se pueden crear plantas sino también órganos transgénicos, como raíces transgénicas (hairy roots), que son transformaciones inducidas por infección del plasmido Ri de Agrobacterium rhizogenes, para integrar el T-ADN en la raíz de la planta (Saitou, 1991), estas raíces pueden tener proliferación activa con fenotipos estables y son productores prometedores de metabolitos primarios y secundarios útiles (Repunte, et all. 1993).

## 2.3. - Armoracia lapathifolia (Gilibert) y su importancia

### 2.3.1. - Clasificación taxonómica y descripción

Armoracia lapathifolia (Gilibert)

Sinonimia. Cochlearia armoracia (Lineo).

Nombre común: rábano picante, rábano magistro o vagistro, silvestre o salvaje, Cochlearia armoracia, rábano rusticano, rábano blanco japonés.

**Clasificación taxonómica:**

**División:** Spermatophyta. **Clase:** Dicotiledónea. **Orden:** cruciales. **Familia:** Cruciferae. **Genero:** *Armoracia*. **Especie:** *laphthifolia*.

**Descripción.**

Planta perenne, cultivada a menudo como anual o bianual (Font Quer, 1973), su número cromosómico es  $2n = 32$  (Naturhistoriska, 1997), tiene una raíz larguísima que puede alcanzar hasta 1 metro, cilíndrica con un diámetro de 5 centímetros (Alcázar, 1957), con la corteza rugosa y amarillenta, interiormente es blanca, algo fibrosa; con sabor acre muy intenso (Tamaro, 1977). Su Tallo es robusto (Font Quer, op cit.), y ramificado de hasta 1.2 m de altura o más si el suelo lo favorece.

Las hojas basales tienen el peciolo largo, son muy grandes miden entre 30 y 50 cm de longitud son ovales en la base y dentadas o festonadas en el borde; las superiores son angostas y de bordes dentados o casi enteros (Alcázar, 1957)

Florece de mayo a junio según las condiciones climáticas en la que se desarrollan. Las flores son blancas, formadas por un cáliz de 4 sépalos cóncavos libres y cruzados, los 4 pétalos cruzados sin adherencia alguna quedan sueltos por lo que se les llama abiertos, con 6 estambres de los cuales 4 son más largos, y de 10 a 40 óvulos. Las flores se agrupan en ramilletes blancos, son numerosas, de olor agradable y de hasta un centímetro de diámetro (Alcázar, op cit.), son polinizadas por el orden himenóptera. El fruto es del tipo silícula, éste es oval, globuloso, áspero, las valvas son obtusas y convexas, y se encuentran sostenidas por peciolos largos; con varias semillas que no son, sin embargo fértiles ya que no maduran en las plantas cultivadas (Tamaro, 1977).

### 2.3.2.- Historia

Es una planta que tiene su centro de origen en el sureste de Rusia y en la parte austroccidental de Asia. (Japón y China). En la edad media fue introducido en Europa y se utilizó como remedio de diversas enfermedades, en España se conoce desde antes del siglo XII denominándolo rábano gallego. Con el descubrimiento de América los colonizadores y emigrantes (principalmente alemanes) lo introdujeron en varios países de América, como son Canadá, EE.UU. y Chile.

### 2.3.3.- Importancia económica

El hombre cultiva y consume la raíz cocida o cruda; y la utiliza para elaborar una especie de mostaza, (Alcazar, op cit., Schamel, 1999). Tienen un sabor fuertemente acre y picante, que recuerda al de la cebolla, intenso sobre todo cuando se machacan, hasta el punto de provocar el lagrimeo.

En el noreste de China se cultiva actualmente en las zonas de Bojing, Heilongjiang, Jilin y Liaoning, (Mobot, 1999). En este continente se consume desde hace mucho tiempo; tanto que es el encurtido más importante que se utiliza en la elaboración del sushi, conocido como wasabi (pasta de rábano verde). El wasabi tiene una gran importancia económica ya que puede tener un costo aproximado de 3.45 dólares por 28.7 gramos (aproximadamente 1 onza, Schamel, 1999).

También se emplea en medicina tradicional, principalmente europea como antiescorbútico, como aperitivo y digestivo por estimular las secreciones de la mucosa gástrica (antidiséptico), (Alcazar, op cit., Horseradish, 2001), como diurético y para combatir la hidropesía, también se utiliza contra el raquitismo y el escrofulismo, solo o combinado con el yodo. (Font Quer, 1973). Por esta forma de uso en Europa se pueden adquirir en la medicina tradicional cápsulas de rábano picante, con un costo de 7.96 dólares por un frasco con 100 cápsulas y esencia de rábano picante con un costo de 10 dólares el bote con ½ de onza (Unige, 1999).

Los países con mayor producción en Europa son Francia Alemania (Shamel 2001) y Holanda mientras que en América son los Estados Unidos de América con una producción es de 6,000 toneladas en 2,717 acres en un tiempo de plantación de 7 meses en promedio, (hort, 1999) y Canadá (Terryshorseradish, 1999).

Se pueden encontrar empresas tanto en Europa como en América que se dedican a la producción de rábano picante como condimentos alimenticios, estos los venden enfrascados como se consume en México la mostaza.

En Europa se encuentra una de las empresas más antiguas, en el país de Alemania la compañía "Herzlich willkommen" la cual empieza su producción en 1856 (Shamel op cit.)

En Canadá se encuentra la empresa "Terry's horseradish" que produce 6 diferentes condimentos alimenticios en presentaciones de frascos de 5 gramos, desde mediados de siglo XX.



En los Estados Unidos de América también podemos encontrar a la compañía "J.R. Kelly company" que comercializa la raíz de rábano en costales o bolsas.

#### Importancia alimenticia de la raíz.

La raíz contiene peroxidasas, además el mismo glucósido sulfurado que la mostaza negra, la sinigrina, y el fermento mironato (mirosina) que lo descompone para producir la esencia de mostaza, el isotiocinato de etilo (que es un producto sulfurado).

La sinigrina y la allicina son sustancias antibióticas (Schamel, op cit.)

También presenta asparagina, glutamina, arginina.

En sus cenizas se puede encontrar: sodio, fierro, nitratos, sulfatos y fosfatos de potasio, calcio y magnesio.

También contiene Vitamina C que se aprovecha cuándo se consume cruda en ensalada, vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, y B<sub>6</sub>; así como aceites esenciales (Font, 1973).

#### 2.4.- Producción de enzimas vegetales.

Por muchos años se han hecho preparaciones rudimentarias de enzimas vegetales. Sin embargo, la extracción de enzimas a nivel industrial a partir de plantas es a menudo difícil y requiere equipo pesado para macerar y moler el material típicamente fibroso.

Los sistemas de molienda comunes por lo general son insuficientes, excepto en los casos donde la fuente de materia es tejido de hojas, es posible usar molinos de martillo de uso rudo modificados. Este tipo de molinos están compuestos de cuatro barras cuadradas de acero llamadas cruz, que giran a una velocidad de 1500 a 2000 vueltas por minuto, proyectando el material a moler contra una parrilla cilíndrica compuesta por un gran número de barras con aristas vivas. Un tamiz separa el polvo de la fibra que vuelve al molino (Schwyzer, 1946). La cantidad de material vegetal que se emplea para la extracción es de toneladas y se obtienen kilogramos de enzima, para lograr esto se requiere de una gran cantidad de reactivos (sustancias químicas) para su separación y purificación, además de una gran cantidad de horas hombre de trabajo.

Los primeros métodos de separación y purificación empleados son, la solubilización y los métodos cromatográficos como la filtración en gel, intercambio iónico y la cromatografía de afinidad (Lobarzewski, 1995).

##### 2.4.1.- Selección de plantas para la producción de enzimas.

Obviamente, la selección de los organismos productores es la clave de los resultados satisfactorios en un proceso enzimático, para esto es necesario tener en cuenta las siguientes características:

Se requiere de un organismo productor estable.

Que no presente demasiados problemas de salud y otros relacionados.

Que no demande atención en sus necesidades de crecimiento, de modo que represente bajos costos de producción.

La productividad enzimática debe ser alta.  
No debe producir toxinas o antibióticos (Scragg, 1996).

## 2.5.- Las peroxidadas.

Son enzimas que han tenido un amplio estudio en el cultivo de tejido vegetales. Las peroxidadas tienen la siguiente clasificación internacional E.C. 1.11.1.7. donador: peróxido de hidrogeno oxidoreductasa, POD; son una familia de isoenzimas fundamentales en todas las plantas superiores.

Son glicoproteínas monoméricas que contienen un grupo hemo, estas utilizan un  $H_2O_2$  u  $O_2$  para oxidar una amplia variedad de moléculas. (Lagrimini, 1990). Con frecuencia se presentan en un gran número de isoformas llamadas isoenzimas, las cuales extienden la actividad enzimática; se localizan generalmente en el citoplasma y/o en membranas, pared celular, vacuolas, y organelos de transporte; en la mayoría de los casos se ha determinado que estas isoenzimas son producto de diferentes genes. (Prado et al. 1999)

Estas enzimas son particularmente abundantes en los rizomas de dos especies de rábano picante: Armoracia lapathyfolia (Gilib) y Armoracia rusticana (Gaert, Mey y Scherb), dichas plantas son utilizadas actualmente para la extracción de la enzima a nivel comercial (Yamada, Y. 1987), obteniendo el extracto crudo que es una mezcla de todas las isoenzimas, o las 7 isoenzimas purificadas (Arellano op cit.)

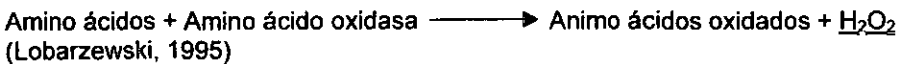
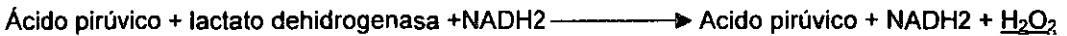
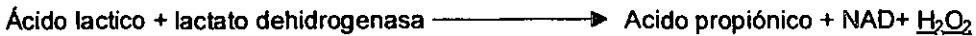
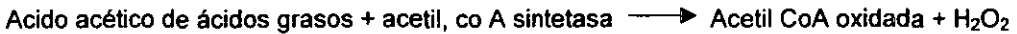
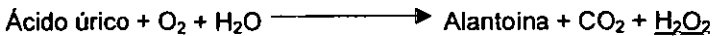
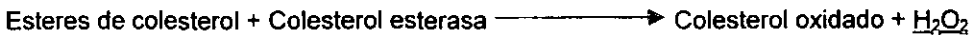
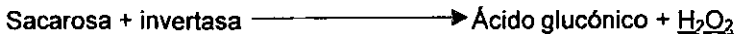
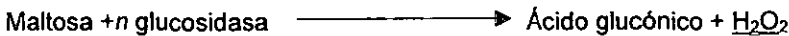
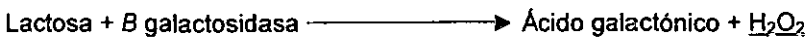
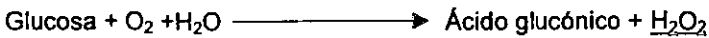
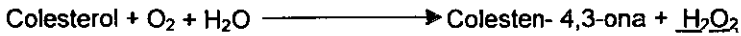
### Importancia económica de la peroxidasa.

La importancia económica de las peroxidadas radica en sus diferentes usos, estos incluyen el análisis químico, el análisis inmunológico, también se utilizan en la industria de tratamiento de aguas residuales (Muralikrishna, 1993; Massey, 1994), también ha sido utilizada en la industria de alimentos para estimar el proceso de blanqueado debido a que son de las enzimas más estables al calor y pueden ser causa de cambios por deterioro por almacenamiento (Prado et al 1999), en los procesos de decoloración usados en la industria en la elaboración de papel y en la industria textil (Egorov, 1995), también se emplean en estudios moleculares y genéticos, además de su importancia en la fisiología vegetal (Schnieder 1995).

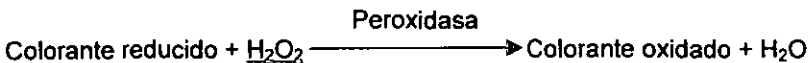
La purificación de las enzimas peroxidasa para uso industrial a partir de métodos tradicionales, ha sido utilizada por las compañías, Merck, Boehringer, Sigma, Aldrich, Fluka y Glycobiology, las cuales comercializan la enzima pura, sus isoenzimas, y conjugados.

## Análisis químico.

En el análisis químico se utilizan principalmente en las pruebas siguientes donde el peróxido de hidrógeno es uno de los productos formados por la reacción.



El peróxido de hidrógeno se mide comúnmente con peroxidasa mediante procedimientos colorimétricos sensibles.



En presencia de  $\text{Mn}^{++}$  y un monofenol adecuado, la peroxidasa cataliza la oxidación de una amplia gama de metabolitos, tales como  $\text{NADH}_2$ ,  $\text{NADPH}$ , triptofano, ác. oxalacético, y el ác. indolacético. (Giovanalli, 1969; Nakane et al. 1974).

### Análisis inmunoenzimático.

Un segundo uso importante se encuentra en el análisis Inmunoenzimático (Cuevas, 1991). En donde la enzima funciona como marcador y debido a la reacción que cataliza, da lugar a un efecto de amplificación, de forma que cada molécula de enzima activa da lugar a la conversión de muchas moléculas de sustrato en producto (Nakane et al, 1974). Algunas ventajas de este método son: no se produce radiación durante el marcaje o con los desechos, el producto marcado puede tener una vida útil muy larga, el equipo empleado para su medición es accesible por que se emplean espectrofotómetros para la cuantificación colorimétrica; y el análisis es rápido ya que se completa en unos minutos y es muy preciso ya que puede detectarse hasta en cantidades de femtomoles. Su desventaja radica en que los constituyentes del plasma pueden influir en la actividad enzimática. Además el análisis de la actividad enzimática puede ser más complicado que el que se realiza con radioisótopos (Gacesa et al, 1990).

### Importancia en la fisiología vegetal.

Las peroxidasas tienen una importante función en la fisiología vegetal (Cuevas, 1991). En particular en la lignificación celular de la pared secundaria por la condensación de alcoholes cinamílicos. La plasticidad de la pared celular en las plantas se encuentra estrechamente relacionada con la naturaleza y el número de enlaces cruzados entre la matriz de polímeros. La presencia de peroxidasa puede disminuir la plasticidad de la pared celular por los enlaces cruzados de moléculas de extensina a través de la formación de enlaces intra e inter-covalentes entre los residuos de tirosina para formar isoditrosina. Los enlaces covalentes cruzados también pueden formarse por la acción de las peroxidasas de la pared celular sobre las pectinas o hemicelulosas por formación de puentes diferulato entre los residuos de ferulato (Fry, 1986). Las peroxidasas aniónicas se han identificado como las más importantes en la actividad de peroxidasa de la pared celular; debido a su alta afinidad por los precursores de lignina (Campa, 1991).

Las peroxidasas moderadamente aniónicas han mostrado tener una alta afinidad por la pared celular especialmente por las áreas ricas en lignina; los niveles de estas isoenzimas se encuentran cuando la planta ha sufrido daño.

Las peroxidasas catiónicas tienen poca actividad en la lignificación, pero son capaces de catalizar la formación de peróxido de hidrógeno, utilizable para otras peroxidasas, su presencia en las raíces se ha atribuido a una actividad de protección contra patógenos del suelo (Prado, 1999).

Se ha demostrado también que la actividad de peroxidasas se incrementa con el avance en la senescencia de los tejidos fotosintéticos de las principales plantas, con la edad fisiológica de las hojas, también el incremento en la actividad de peroxidasa es uno de los indicadores más confiables de la madurez y senescencia (Parish 1968; Ford, 1988).

Las peroxidasas también tienen influencia en el metabolismo de hormonas, tiene actividad degradativa del ácido indolacético y alcaloides (Rasmussen, 1997), en la formación de cutina y suberina (Dean, 1994).

## 2.5.2. - Aplicaciones

### Tratamiento de aguas residuales

Se utilizan en el tratamiento de aguas residuales, en donde las peroxidasas son capaces de degradar compuestos altamente tóxicos. Son capaces de catalizar la oxidación de un amplio número de contaminantes fenólicos (Massey, 1994) entre los que se encuentran 4-clorofenol, p-cresol, el pentaclorofenol (Aitken, 1994) y el 2,4 diclorofenol (Dec, 1994). También pueden degradar el color en aguas de desecho en periodos de cuarenta y ocho horas (Ferrer, 1991).

Catalizan la desulfonación de compuestos como el ácido 3,5 dimetil - 4, hidroxibencenosulfónico al oxidar sus anillos aromáticos (Muralikrishna, 1993 ), así como la polimerización del carbón en solventes orgánicos (Blinkousky, 1994), sirven para oxigenar tiobenzamidas y tioanisoles mediante la sulfoxidación (Doerge, 1991), oxidan tioles (Suensson, 1988), y al ácido indolacético (Pressey, 1990), a demás catalizan la formación del herbicida 5-Triacina y la atracina en presencia de peroxido de hidrogeno y del ion Cloro (Cordewener, 1991).

### Estudios moleculares y genéticos.

Los estudios de las peroxidasas han tenido aplicación para la obtención de aportaciones realizadas a estudios moleculares y genéticos, en los cuales se han determinado las secuencias genéticas de DNA de peroxidasas aniónicas de lino, las cuales contienen 1153 nucleótidos, y 297 amino ácidos con un peso molecular de 31.9 KDa, y un pI 4.5 (Omann, 1994).

También las plantas u órganos modificados genéticamente (transgénicos) han ayudado a identificar las secuencias (dominios) relacionados con la inhibición del crecimiento de la planta y la actividad tóxica de las peroxidasas, la secuencia esta formada por 192 nucleótidos con un total de 299 amino ácidos, y puede ser parte del sitio activo del enzima (Bartonek-Roxa, 1994). Otros estudios realizados demostraron que las peroxidasas pueden servir como marcadores en estudios taxonómicos, ya que se encontró con una secuencia de 18 amino ácidos, que demostró la estrecha relación entre las peroxidasas de organismos microbianos, plantas y animales, con estos datos fue posible realizar dendogramas que relacionaron a las diferentes especies aportando un mayor conocimiento en la taxonomía. (Tyson, 1992).

En presente trabajo, se pretendió buscar las condiciones óptimas para el desarrollo de plantas de rábano picante "in vitro", así como conocer si hay diferencias en la actividad de peroxidasa de los diferentes sistemas de cultivo, por lo cual se plantearon los siguientes objetivos.

### III.-OBJETIVOS.

#### 3.1.- OBJETIVO GENERAL.

MICROPROPAGACION IN VITRO DE LA RAIZ DE Armoracia lapathifolia (Gilib) EN DOS MEDIOS DE CULTIVO.

#### 3.2.- OBJETIVOS PARTICULARES.

Establecer el mejor medio de cultivo para Armoracia lapathifolia, y Armoracia lapathifolia transgénica.

Evaluar la producción de la raíz de Armoracia lapathifolia, y Armoracia lapathifolia transgénica en diferentes condiciones de fotoperiodo y medios de cultivo.

Evaluar y comparar la actividad de peroxidasa, en los cultivos propuestos.

En presente trabajo, se pretendió buscar las condiciones óptimas para el desarrollo de plantas de rábano picante "in vitro", así como conocer si hay diferencias en la actividad de peroxidasa de los diferentes sistemas de cultivo, por lo cual se plantearon los siguientes objetivos.

### III.-OBJETIVOS.

#### 3.1.- OBJETIVO GENERAL.

MICROPROPAGACION IN VITRO DE LA RAIZ DE Armoracia lapathifolia (Gilib) EN DOS MEDIOS DE CULTIVO.

#### 3.2.- OBJETIVOS PARTICULARES.

Establecer el mejor medio de cultivo para Armoracia lapathifolia, y Armoracia lapathifolia transgénica.

Evaluar la producción de la raíz de Armoracia lapathifolia, y Armoracia lapathifolia transgénica en diferentes condiciones de fotoperiodo y medios de cultivo.

Evaluar y comparar la actividad de peroxidasa, en los cultivos propuestos.

## IV.- MATERIAL Y MÉTODO.

### 4.1.- Selección del material vegetal.

Se utilizaron dos cultivos de Armoracia lapathifolia. El rábano utilizado se obtuvo de manera comercial y el rábano transgénico fue una donación del profesor Jesús Arellano quien realizó la transformación del rábano del mismo cultivo comercial, en el trabajo de su tesis doctoral "Establecimiento de sistemas de cultivo de raíces transformadas para la producción de metabolitos de importancia económica", realizado en el IPN.

Se utilizaron raíces jóvenes y viejas para ambos cultivos con el fin de determinar cual de las dos etapas, representaba la mejor alternativa de propagación.

Los cultivos fueron:

<u>Armoracia lapathifolia</u> joven,	ó	Rábano joven 8 semanas
<u>Armoracia lapathifolia</u> vieja,	ó	Rábano viejo. más de 6 meses
<u>Armoracia lapathifolia</u> transgénica joven,	ó	Rábano transgénico joven. 8 semanas de cultivo
<u>Armoracia lapathifolia</u> transgénica vieja,	ó	Rábano transgénico viejo. Más de 6 meses de cultivo

Se sembraron diferentes inóculos para determinar el más adecuado para la micropropagación, después de haber obtenido la propagación, las raíces se subcultivaron con fotoperiodo y sin el, mientras que los cultivos viejos, se manejaron en medio líquido sin fotoperiodo (en oscuridad).

Los grupos control se obtuvieron de las hojas de plantas de Rábano y Rábano transgénico, respectivamente, las cuales se cultivaron en invernadero, con un año de edad.

Los grupos control para las actividades de peroxidasa se obtuvieron de las raíces de las plantas en invernadero, con un año de edad.

### 4.2.- Inóculo.

De las líneas jóvenes se realizaron cultivos in vitro de los diferentes inóculos, estos fueron: tallo, peciolo y hoja.

Esto para determinar el inóculo más apropiado para la micropropagación de raíz, por medio del porcentaje de respuesta.



De cada cultivo se sembraron 5 inóculos por frasco con diez repeticiones para cada inóculo, el tamaño del inóculo fue de un centímetro cuadrado y un peso de 0.02 gramos aproximadamente

De las líneas denominadas viejas el inóculo fue la raíz misma, se propagó por división.

Para los grupos control el inóculo se realizó de hojas de planta cultivada en invernadero.

La desinfección superficial para éste inóculo fue:

Los inóculos con un tamaño de 3 a 4 centímetros, se lavaron con agua y jabón; se enjuagaron, y se introdujeron en una solución de alcohol al 80 % por un minuto, se enjuagaron nuevamente y se introdujeron en una solución de hipoclorito de sodio (cloro comercial) al 3 % por cinco minutos, y se enjuagaron cuatro veces con agua destilada.

Las hojas fueron fragmentadas para obtener un tamaño de inóculo, de un centímetro cuadrado, y una densidad de siembra de cinco inóculos por frasco con diez repeticiones.

#### 4.3.-Medios de cultivo

Los inóculos de rábano joven y el rábano viejo, fueron cultivados en un medio Murashige y Skoog, MS (1962) ver apéndice, complementado con sacarosa al 3.0 %, agar bacteriológico a 0.8 % en medios sólidos y ácido naftalenacético (ANA) 1mg/L., cinetina (KIN) 0.1mg/L como reguladores de crecimiento.

Los inóculos de rábano transgénico joven y rábano transgénico viejo fueron cultivados en el medio M S, complementado con sacarosa al 3.0 %, ácido morfolinoetanosulfónico (MES) 5.0 mM y ácido ascórbico 150.0 mg /L y en los medios sólidos agar bacteriológico al 0.8 % (Arellano, 1995).

El medio de tuberización (ver apéndice), se utilizó para inducir un mayor grosor de la raíz. Es un medio que utiliza las sales de Murashige y Skoog, complementado con mio-inositol 100 mg / L, cinetina 3.5 mg / L, tiamina 0.4 mg/L, sacarosa 6 %, agar bacteriológico 0.7 % (Ortiz, 1987). El medio se preparó con la misma fórmula, sin adicionar el agar bacteriológico, para los tres diferentes medios.

Para los grupos control se utilizó el medio MS complementado con sacarosa 3.0%, agar bacteriológico al 0.8 % sin reguladores de crecimiento.

#### 4.4.- Condiciones de incubación.

	Cultivo comercial	Cultivo transgénico
Con fotoperiodo	Se incubaron en fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad, con una intensidad luminosa de 15 w /m <sup>2</sup> ó 3000 lux, una temperatura promedio de 27° C y una humedad relativa de 80 %, los medios líquidos tuvieron una agitación continua de 77 rpm	
Sin fotoperodo	Incubación en obscuridad a una temperatura promedio de 25° C y una humedad relativa de 80 %, los medios líquidos tuvieron una agitación continua de 77 rpm	

#### 4.5.-Obtención del extracto crudo.

La obtención del extracto se llevó a cabo en una solución de regulador de fosfatos, a 4° C, en proporción de 1g de tejido por 3 partes de buffer de extracción

Se obtuvo el peso fresco de la raíz (en mg) de las líneas que permanecieron en cultivo por ocho semanas. Se maceró el tejido vegetal en un mortero, el cual contenía regulador de fosfatos 10mM pH 6.2. El tejido y el regulador se mantuvieron en proporción de 1:3. Todo éste proceso se llevó a cabo en un baño de hielo a 4° C. El extracto macerado se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min

Se colectó el sobrenadante y se midió el volumen colectado, en alícuotas las cuales se mantuvieron en refrigeración. Con éste extracto se realizó la cuantificación de las proteínas totales por el método de Bradford (García, 1998) y la determinación de la actividad enzimática de las peroxidasas.

De las alícuotas en refrigeración se tomaron los mililitros necesarios para cuantificar, la cantidad de proteínas, y la actividad enzimática de las peroxidasas

#### 4.6.- Determinación de la actividad de las peroxidasas, (Rao, et al. 1995).

La determinación de las enzimas peroxidasas se realizó por el método de guayacol:

De las alícuotas en refrigeración obtenidas en la extracción del extracto crudo, se tomaron 320 microlitros, a los que se les adicionó 500 microlitros de guayacol al 1%, 7.08 mililitros de regulador de fosfatos 10mM pH 6.2, y 100 microlitros de peróxido de hidrógeno homogeneizando mediante agitación suave. La reacción se incubó a 28 ° C. El color que se desarrolló, fue leído a una absorbancia de 470 nm en un espectrofotómetro. Los datos obtenidos se interpolaron en la curva estándar de la actividad de peroxidasas (ver apéndice), para obtener la actividad específica.

#### 4.8.- Determinación del mejor cultivo.

Para determinar cual fue el mejor medio de cultivo se tomaron en cuenta parámetros cuantitativos de los cuales se midieron las siguientes variables.

Número de raíces; Longitud radicular; Diámetro radicular: Para las tres variables se midieron el total de raíces por inóculo incluyendo grandes y pequeñas, obteniéndose la media ( $\bar{x}$ ), desviación estandar ( $\sigma$ ) y error estandar ( $\sigma^2$ ) de los datos, con un total de 50 muestras para cada variable (n=50)

La prueba estadística que se aplicó a las variables evaluadas fue, la prueba de ANOVA, con el fin de determinar las diferencias entre los cultivos.

Posteriormente se utilizó la Prueba de Tukey ( Comparación múltiple de medias) para determinar entre cuales tratamientos hay mayor y menor diferencia; con un nivel de significancia del 5%. Las pruebas estadísticas se realizaron en el programa "Statistica for windows, 4.5".

## V.- RESULTADOS.

### 5.1.- Confirmación de la transformación

Para confirmar que aun se expresaba la transformación de las raíces del cultivo transgénico, se realizaron observaciones morfológicas, a si como la capacidad de los cultivos transgénicos para crecer sin reguladores de crecimiento, se realizó la comparación de los cultivos de rábano comercial joven y rábano transgénico joven.

#### Observaciones morfológicas.

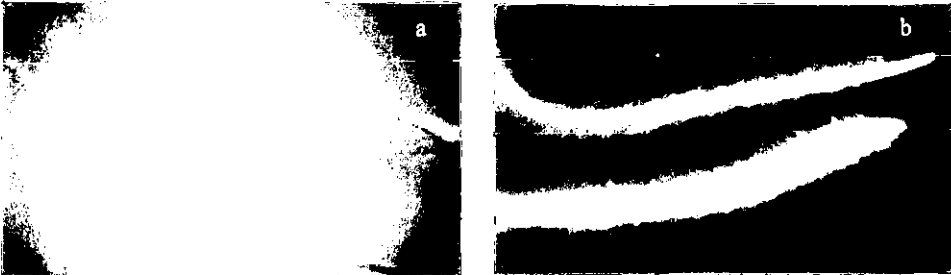


Fig.1.- Se pueden observar las diferencias que existen entre los cultivos de; a) rábano, comercial b)rábano transgénico.

El rábano comercial joven, presenta la raíz fina sin mucha vellosidad (fig.1 a), en cambio la raíz del rábano transgénico, se observa con vellosidad en toda su longitud (fig. 1 b), a este fenómeno se le conoce como "hairy roots" y es característico de la transformación genética con Agrobacterium rhizogenes. (Saitou, 1991).

#### Capacidad de crecimiento sin reguladores de crecimiento.



Fig.2.- Crecimiento sin reguladores de crecimiento, a) rábano comercial, b) rábano transgénico.

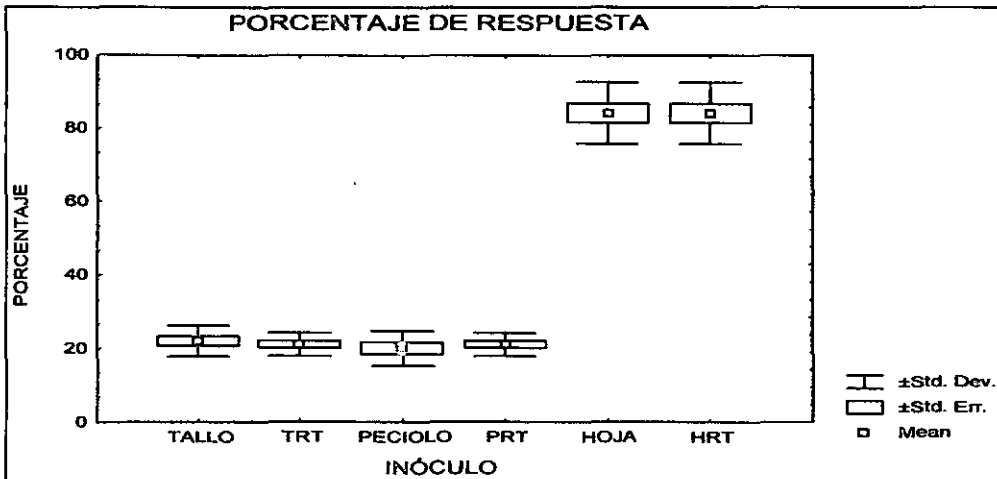
El rábano comercial presentó un crecimiento lento y escaso sin reguladores de crecimiento, (fig. 2 a), mientras el rábano transgénico presentó un buen crecimiento lo cual confirmó su transformación genética (fig. 2 b).

5.2.- Respuesta de los diferentes inóculos en cultivo de tejidos.



Fig.3.- Morfogénesis directa de raíz del inóculo de hoja. a) rábano comercial, b) rábano transgénico.

El inóculo de hoja tuvo una respuesta favorable al desarrollar morfogénesis directa de raíz, como se puede observar en la fig.3. Desde el inicio del desarrollo radicular se aprecia una diferencia morfológica. El rábano comercial tiene raíces pequeñas y lisas (fig. 3 a), y el rábano transgénico presenta un mejor desarrollo y crecimiento radicular secundario (fig. 3 b).

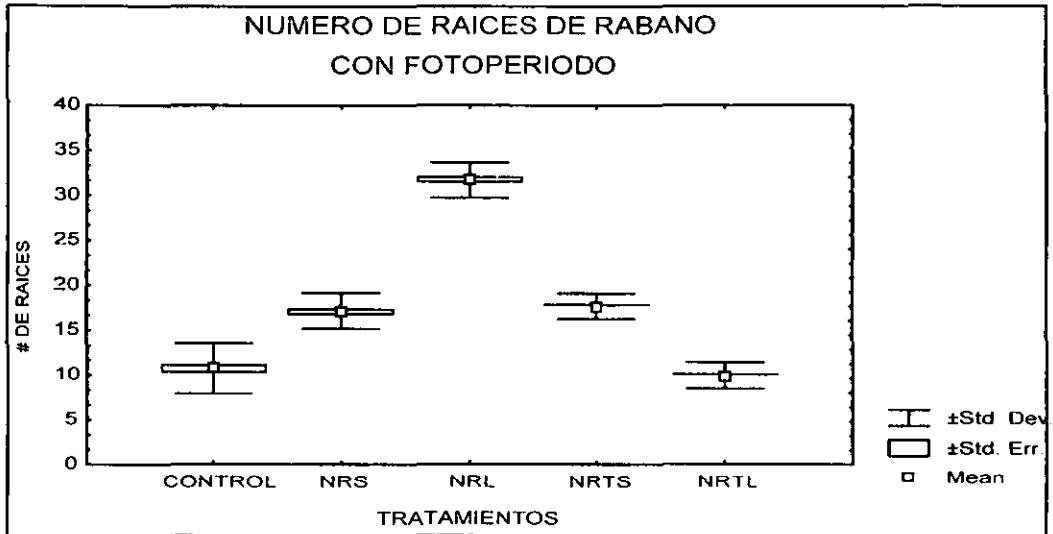


Gráfica 1.- Se pueden observar los porcentajes de respuesta para los diferentes inóculos, teniendo una mejor respuesta el inóculo de hoja para ambos cultivos. Tallo, peciolo, y hoja se refieren al cultivo de rábano comercial; TRT.- Inóculo de tallo de rábano transgénico, PRT.- Inóculo de peciolo de rábano transgénico, HRT.- Inóculo de hoja de rábano transgénico.

Con los resultados obtenidos en los cultivos de los diferentes inóculos se determinó que el inóculo de hoja era el más adecuado por su alto porcentaje de respuesta como se puede ver en la grafica 1, además éste inóculo presentó morfogénesis directa de raíz, (ver fig. 3), lo cual fue muy favorable para el propósito de éste trabajo.

5.3.- RESULTADOS ESTADISTICOS DE LOS CULTIVOS DE TEJIDOS VEGETALES

Respuesta del número de raíces en los tratamientos de Rábano comercial joven con fotoperiodo.

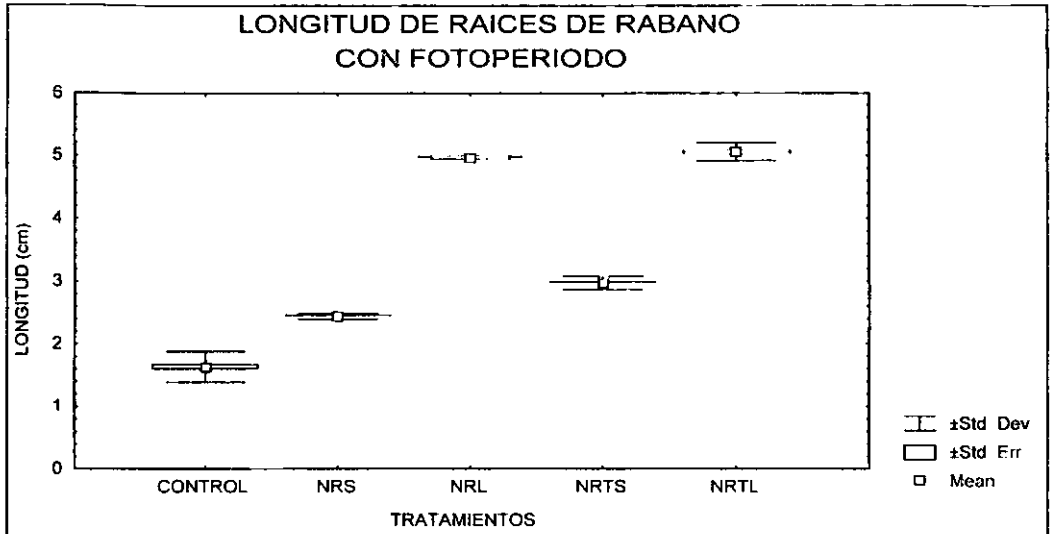


Gráfica 2. CONTROL -Es un cultivo obtenido del rábano comercial de un año de edad en invernadero el cual se cultivó sin reguladores de crecimiento. NRS - Cuantificación del número de raíces del cultivo de rábano comercial joven, en un medio sólido. NRL.- Cuantificación del número de raíces del cultivo de rábano comercial joven, en un medio líquido. NRTS - Cuantificación del número de raíces del cultivo de rábano comercial joven, en un medio de tuberización sólido. NRTL - Cuantificación del número de raíces del cultivo de rábano comercial joven, en un medio de tuberización líquido.

En la gráfica 2 se observa que el cultivo de rábano comercial joven en un medio MS líquido es el que presenta el mayor número de raíces ( $\bar{X} = 31.7$ ).

Al realizar el análisis estadístico de ANOVA se obtuvo que  $F_{calculada} = 1832.21$  siendo mayor a  $F_{245,4,0.05} = 2.41$  concluyendo con esto que si hay diferencias significativas entre los tratamientos. Por lo tanto se realizó la prueba de Tukey, obteniendo que el rábano en el medio MS líquido es el que presentó mayor diferencia entre los tratamientos, hasta de 21.73 raíces con el tratamiento de rábano comercial en un medio de tuberización líquido, el cual presentó el menor número de raíces ( $\bar{x} = 9.97$ ), y una diferencia de 20.96 raíces con respecto al grupo control.

Respuesta de la longitud de las raíces en los tratamientos de Rábano comercial joven con fotoperiodo.



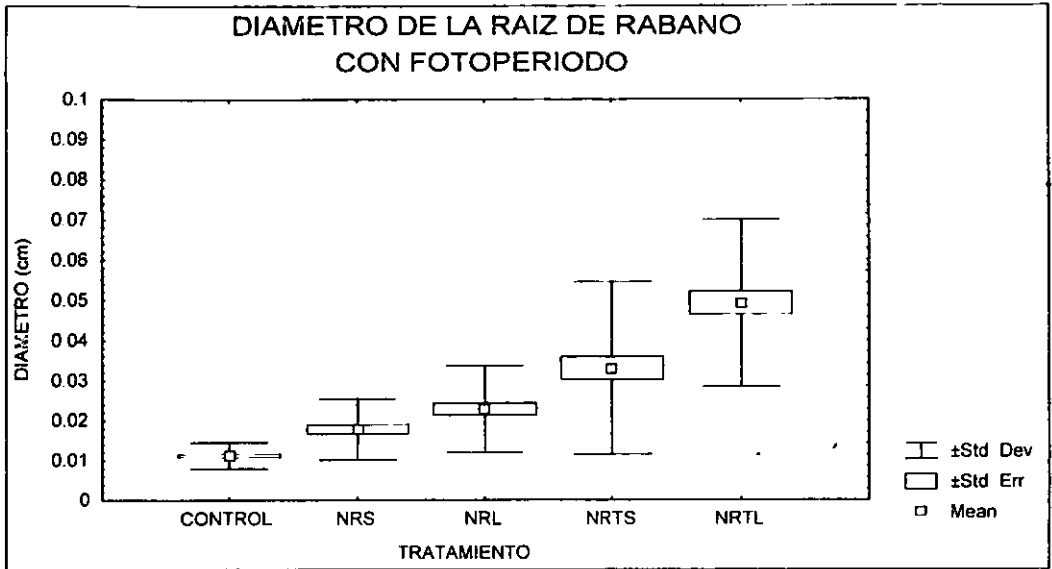
**Gráfica 3.-CONTROL.-**Es un Cultivo obtenido del rábano comercial de un año de edad en invernadero el cual se cultivó sin reguladores de crecimiento. **NRS.-** Cultivo de rábano comercial, en un medio sólido. **NRL.-** Cultivo de rábano comercial, en un medio líquido. **NRTS.-** Cultivo de rábano comercial, en un medio de tuberización sólido. **NRTL.-** Cultivo de rábano comercial, en un medio de tuberización líquido.

En la gráfica 3 se observa, que el rábano comercial en un medio de tuberización líquido es el que mostró mayor longitud de raíces (5.056 cm), y que el grupo control es el que presentó menor longitud radicular.

Al realizar el análisis de ANOVA, se obtuvo que si hubo diferencias significativas entre los tratamientos ya que  $F_{calculada} = 6203.653$ , siendo mayor a  $F_{245,4,0.50} = 2.41$ .

Al hacer la comparación múltiple de medias se obtuvo que el cultivo de rábano comercial en medio de tuberización líquido fue el que presentó mayor diferencia entre los tratamientos, siendo mayor con el grupo control de 3.42 cm.

Respuesta del diámetro de las raíces en los tratamientos de Rábano comercial joven con fotoperiodo.



Gráfica 4.- CONTROL.-Es un Cultivo obtenido del rábano comercial de un año de edad en invernadero el cual se cultivó sin reguladores de crecimiento. NRS.- Cultivo de rábano comercial, en un medio sólido. NRL.- Cultivo de rábano comercial, en un medio líquido. NRTS.- Cultivo de rábano comercial, en un medio de tuberización sólido. NRTL - Cultivo de rábano comercial, en un medio de tuberización líquido.

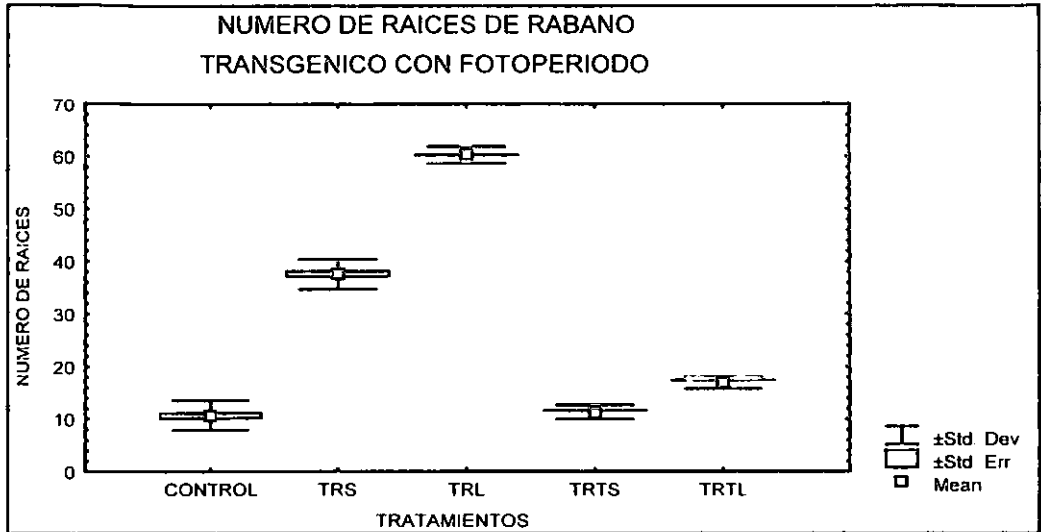
En la gráfica 4 se aprecia que el tratamiento de rábano comercial en un medio de tuberización líquido presentó el mayor diámetro de raíces ( $\bar{x} = 0.049$ ). Y el grupo control fue el que presentó el menor diámetro radicular (0.011cm).

Estos cultivos presentaron diferencias estadísticas significativas ya que la  $F_{calculada} = 51.91$ , fue mayor que la  $F_{245,4,0.05} = 2.41$ . Y para determinar entre cuales tratamientos se encontraban las diferencias se realizó la prueba de Tukey.

Al realizarse la comparación múltiple de medias (Tukey) se obtuvo que el rábano en medio de tuberización líquido, mostró diferencias con todos los tratamientos, y la diferencia más grande con el grupo control (0.038 cm).



Respuesta del número de raíces en los tratamientos de Rábano transgénico joven con fotoperiodo.



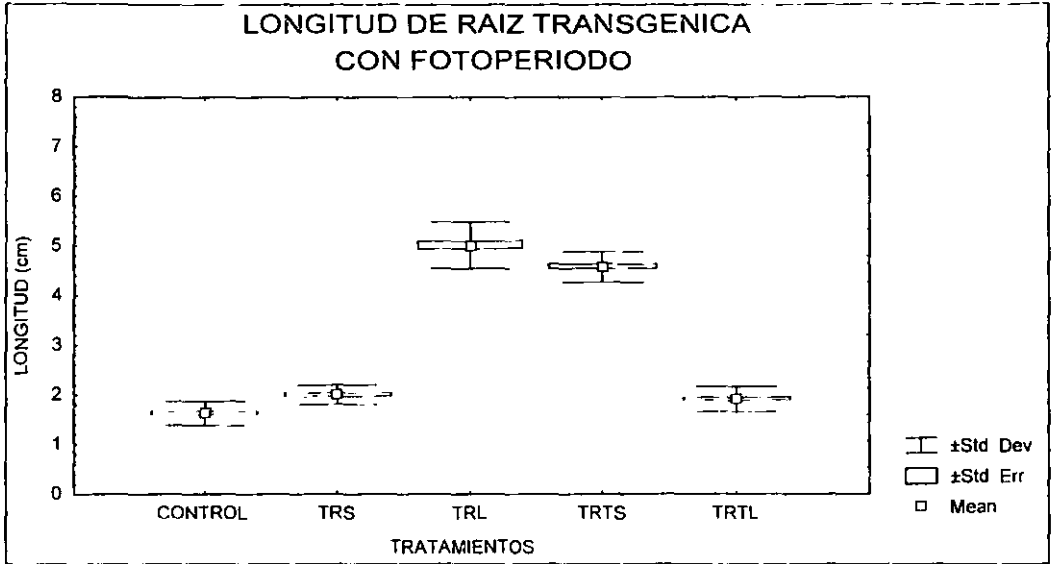
**Gráfica 5.-** CONTROL.- Es un Cultivo obtenido del rábano comercial de un año de edad en invernadero el cual se cultivó sin reguladores de crecimiento. TRS.- Cultivo de rábano transgénico, en un medio sólido. TRL - Cultivo de rábano transgénico, en un medio líquido. TRTS.- Cultivo de rábano transgénico, en un medio de tuberización sólido. TRTL.- Cultivo de rábano transgénico, en un medio de tuberización líquido

En la gráfica 5 podemos observar que el tratamiento de rábano en un medio MS líquido presentó mayor número de raíces (60.56), y que el grupo control es la que tiene el menor número radicular (10.74).

Para conocer si las diferencias eran estadísticamente significativas fue realizado el análisis estadístico de ANOVA donde se obtuvo que  $F_{calculada} = 14419.06$  fue mayor a  $F_{245,4,0.05} = 2.41$ , concluyendo con esto que si hay diferencias significativas.

Por lo tanto se realizó la prueba de Tukey obteniendo que el rábano transgénico joven en el medio MS líquido (TRL) demostró diferencias con todos los tratamientos siendo mayor con el grupo control (49.82 raíces).

Respuesta de la longitud de las raíces en los tratamientos de Rábano transgénico joven con fotoperiodo.

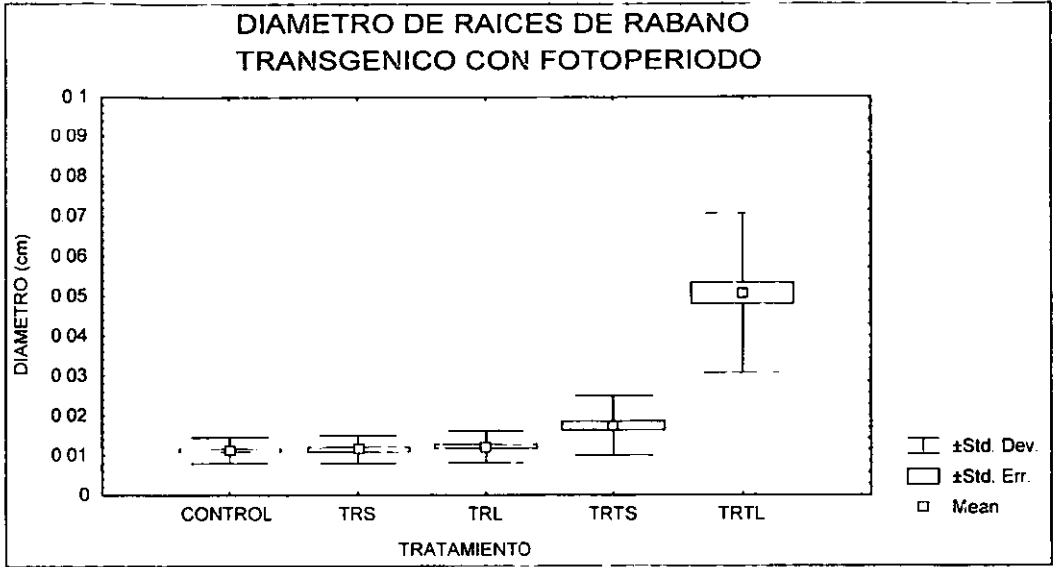


Gráfica 6.- CONTROL.-Es un Cultivo obtenido del rábano comercial de un año de edad en invernadero el cual se cultivó sin reguladores del crecimiento. TRS.- Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio sólido. TRL.- Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio líquido. TRTS.- Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio de tuberización sólido. TRTL.- Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio de tuberización líquido.

En la gráfica 6 se puede apreciar que el tratamiento de rábano transgénico en un medio MS líquido (TRL) fue el que presentó la mayor longitud radicular (5.02 cm), y que el grupo control es la que tiene la menor longitud radicular (1.63 cm).

Al realizar el análisis de ANOVA se obtuvo que  $F_{calculada} = 1373.05$  fue superior que la de tablas  $F_{245,4,0.05} = 2.41$  concluyendo con esto que si hay diferencias significativas entre los tratamientos. Para determinar entre cuales hubo mayor diferencia se realizó la prueba de Tukey, ésta demostró que el rábano transgénico joven en el medio MS líquido presentó diferencias con todos los tratamientos, siendo mayor con el grupo control (3.39 cm). Mientras que los tratamientos de rábano transgénico joven en medio MS sólido (TRS) y el rábano transgénico joven en medio de tuberización líquido (TRTL) fueron los únicos que no presentaron diferencias entre ellos.

Respuesta del diámetro de las raíces en los tratamientos de Rábano transgénico joven con fotoperiodo.

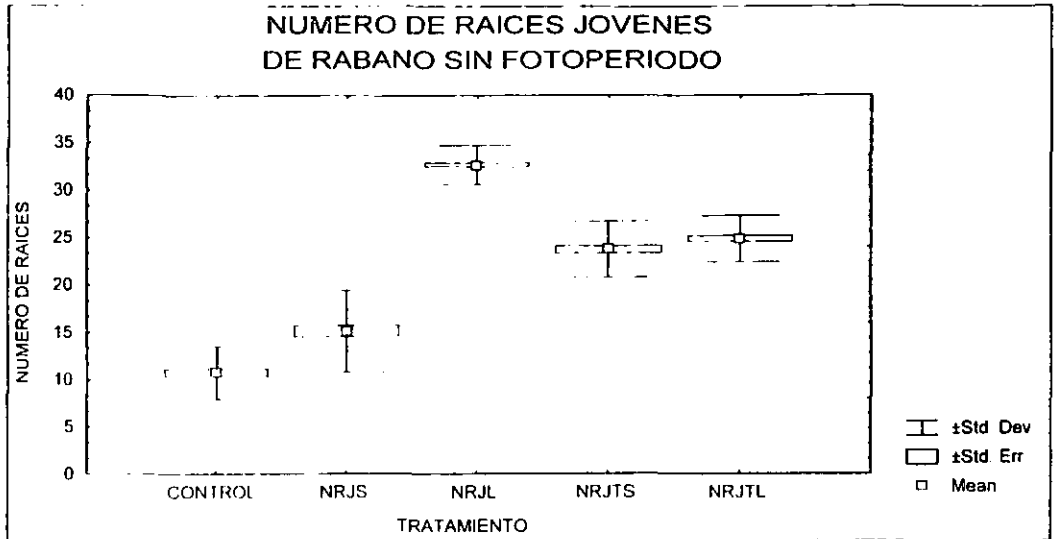


Gráfica 7.-CONTROL.-Es un cultivo obtenido del rábano comercial joven de un año de edad en invernadero el cual se cultivó sin reguladores del crecimiento. TRS.- Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio sólido. TRL.- Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio líquido. TRTS - Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio de tuberización sólido. TRTL - Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio de tuberización líquido.

En la gráfica 7 se percibe que el tratamiento de rábano transgénico joven en un medio de tuberización líquido es el que presenta mayor diámetro en las raíces (0.051 cm). Y que el grupo control es la que tiene el menor diámetro radicular (0.011 cm).

Al realizar el análisis ANOVA se obtuvo que  $F_{calculada} = 146.65$  siendo mayor a  $F_{245,4,0.05} = 2.41$  concluyendo con esto que si hay diferencias significativas entre los tratamientos. Al aplicar la prueba de Tukey se obtuvo que el rábano transgénico joven en un medio de tuberización líquido (TRTL) y el grupo control fueron los tratamientos que demostraron mayor diferencias (0.039cm). EL medio TRTL mostró diferencias con todos los tratamientos, mientras que en los tres primeros tratamientos (control, TRS, y TRL) que se observan en la gráfica 7 no presentaron diferencias entre ellos.

Respuesta del número de raíces en los tratamientos de Rábano comercial joven sin fotoperiodo.



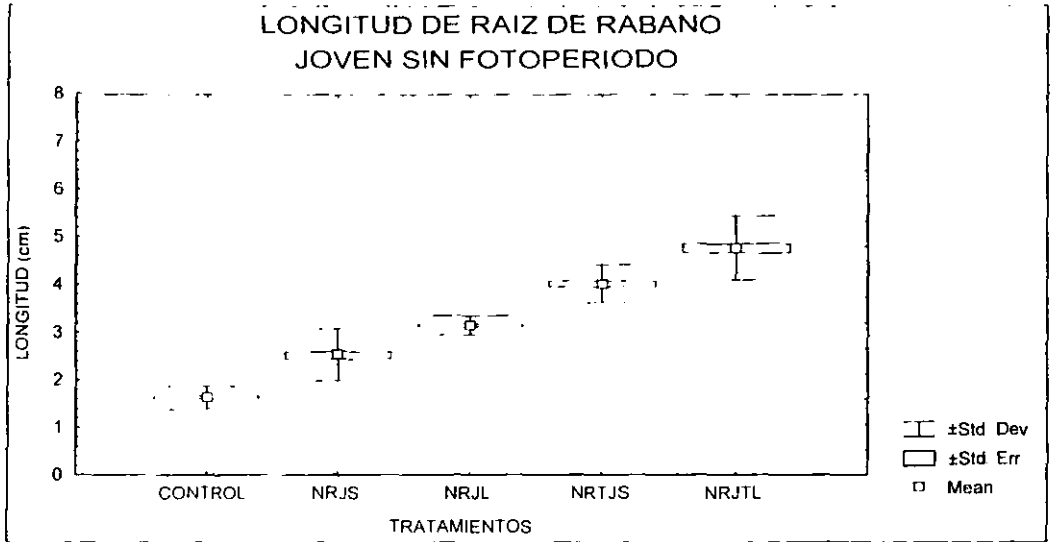
Gráfica 8.- CONTROL -Es un cultivo obtenido de rábano comercial de un año de edad en invernadero el cual se cultivó sin reguladores de crecimiento NRS - Cultivo de rábano comercial, en un medio sólido en obscuridad NRL.- Cultivo de rábano comercial joven, en un medio líquido en obscuridad NRTS - Cultivo de rábano comercial joven, en un medio de tuberización sólido en obscuridad NRTL - Cultivo de rábano comercial joven, en un medio de tuberización líquido en obscuridad

En la gráfica 8 el rábano comercial joven crecido en medio MS líquido presentó mayor número de raíces (32.66). Y que el grupo control es el que tiene menor número radicular (10.74).

Para determinar si los tratamientos fueron diferentes se realizó el análisis de ANOVA, obteniéndose que  $F_{calculada} = 408.15$  fue mayor que la de tablas  $F_{245,4,0.05} = 2.41$  concluyendo con esto que sí hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Ahora bien para saber entre cuales tratamientos se encontraban las diferencias se realizó la prueba de Tukey obteniendo que el rábano comercial joven en medio MS líquido (NRJL) y el grupo control presentaron la mayor diferencia (21.92 raíces).

Respuesta de la longitud de las raíces en los tratamientos de Rábano comercial joven sin fotoperiodo



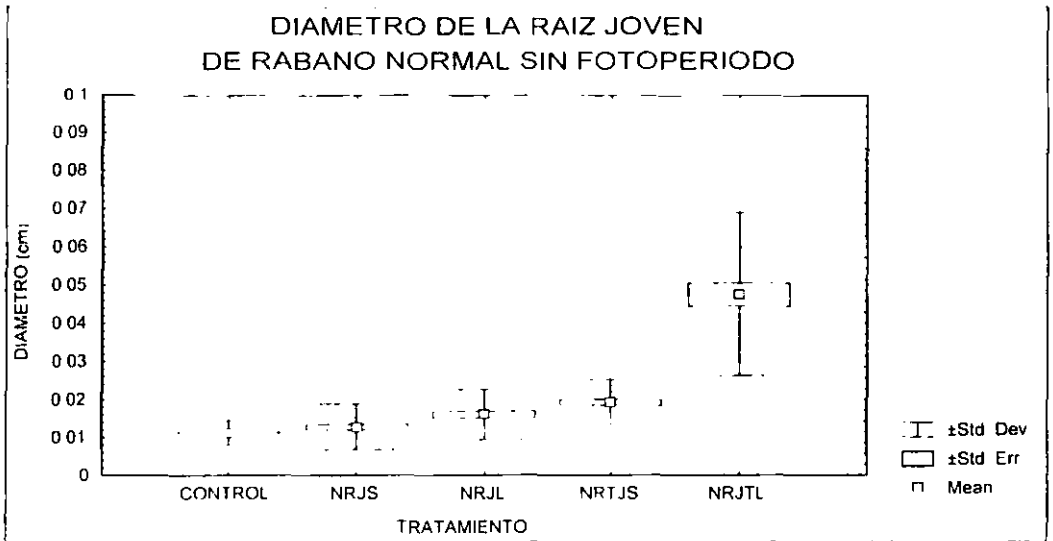
Gráfica 9.- CONTROL - Es un cultivo obtenido del rábano comercial de un año de edad en invernadero el cual se cultivó sin reguladores de crecimiento NRS - Cultivo de rábano comercial joven, en un medio sólido en obscuridad NRL - Cultivo de rábano comercial joven, en un medio líquido en obscuridad NRTS - Cultivo de rábano comercial joven, un medio de tuberización sólido en obscuridad NRTL - Cultivo de rábano comercial joven, en un medio de tuberización líquido en obscuridad

En la gráfica 9 se observa que el tratamiento de rábano comercial joven en un medio de tuberización líquido presentó la mayor longitud de raíces (4.76 cm), mientras que el grupo control presentó la menor longitud radicular (1.63 cm).

Al realizar el análisis estadístico de ANOVA se obtuvo que  $F_{calculada} = 375.26$  siendo mayor a  $F_{245,4,0.05} = 2.41$ , concluyendo con esto que sí hay diferencias significativas entre todos los tratamientos.

Por lo tanto se realizó la prueba de Tukey, obteniendo que el rábano comercial joven en el medio de tuberización líquido y el grupo control fueron los que mostraron mayor diferencia entre los tratamientos, de 3.13 cm de longitud. Además se observó que todos los tratamientos presentaron diferencias entre sí.

Respuesta del diámetro de las raíces en los tratamientos de Rábano comercial joven sin fotoperiodo



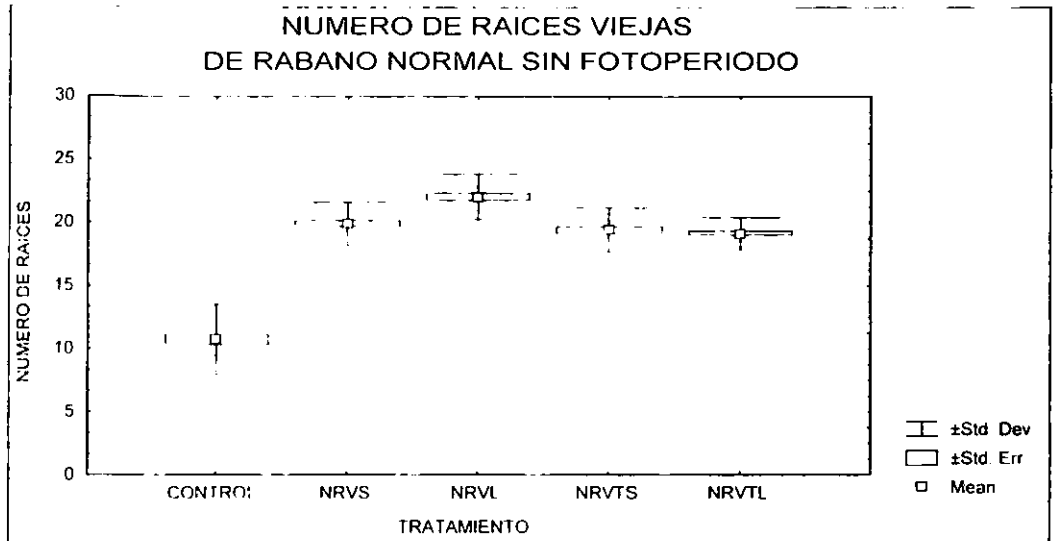
Gráfica 10.- CONTROL -Es un cultivo obtenido del rábano comercial de un año de edad en invernadero el cual se cultivó sin reguladores del crecimiento. NRS - Cultivo de rábano comercial joven, en un medio sólido en obscuridad. NRL.- Cultivo de rábano comercial joven, en un medio líquido en obscuridad. NRTS - Cultivo de rábano comercial joven, en un medio de tuberización sólido en obscuridad. NRTL - Cultivo de rábano comercial joven, en un medio de tuberización líquido en obscuridad.

En la gráfica 10 se observa que el tratamiento de rábano comercial joven en un medio de tuberización líquido (NRJTL) es el que presentó el mayor diámetro en las raíces (0.048 cm), y que el grupo control fue el que mostró el menor diámetro radicular (0.011 cm).

Al realizar el análisis de ANOVA se obtuvo que  $F_{calculada} = 95.76$  siendo mayor a  $F_{245,4,0.05} = 2.41$  concluyendo con esto que si hay diferencias significativas entre los tratamientos.

En la prueba de Tukey se obtuvo que el rábano comercial joven en el medio de tuberización líquido (NRJTL) y el grupo control fueron los tratamientos que presentaron mayor diferencia en cuanto al diámetro que fue de 0.37 cm.

Respuesta del número de raíces en los tratamientos de Rábano comercial viejo sin fotoperiodo.

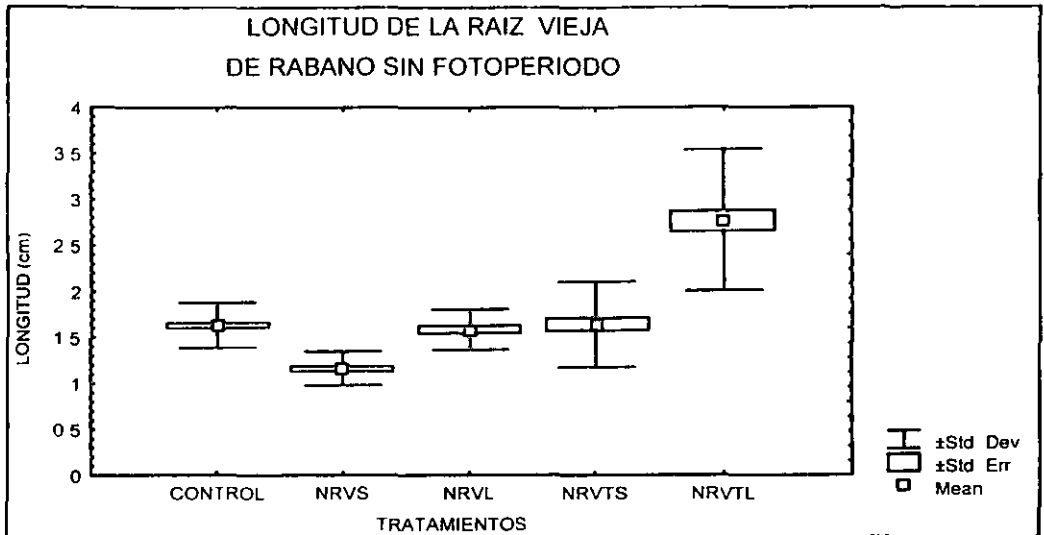


Gráfica 11.- CONTROL -Es un cultivo obtenido del rábano comercial de un año de edad en invernadero el cual se cultivó sin reguladores de crecimiento NRS - Cultivo de rábano viejo, en un medio sólido en obscuridad. NRL - Cultivo de rábano viejo, en un medio líquido en obscuridad NRTS - Cultivo de rábano viejo, en un medio de tuberización sólido en obscuridad NRVL - Cultivo de rábano viejo, en un medio de tuberización líquido en obscuridad

En la gráfica 11 se aprecia que el rábano viejo en un medio MS líquido es el que presentó mayor número de raíces (19.14), y el grupo control es el que tuvo el menor número radicular (10.74).

Al realizar el análisis de ANOVA se obtuvo que  $F_{calculada} = 251.03$  siendo mayor a  $F_{245,4,0.05} = 2.41$  concluyendo con esto que si hay diferencias significativas entre los tratamientos. La prueba de Tukey mostró que la mayor diferencia se presentó entre los cultivos de rábano viejo crecidos en medio MS líquido y el grupo control, con una diferencia de 11.32 raíces.

Respuesta de la longitud de las raíces en los tratamientos de Rábano viejo sin fotoperiodo.



Gráfica 12.- CONTROL -Es un cultivo obtenido del rábano comercial de un año de edad en invernadero el cual se cultivó sin reguladores de crecimiento. NRS - Cultivo de rábano viejo, en un medio sólido en obscuridad. NRL - Cultivo de rábano viejo, en un medio líquido en obscuridad. NRTS - Cultivo de rábano viejo, en un medio de tuberización sólido en obscuridad. NRRTL - Cultivo de rábano viejo, en un medio de tuberización líquido en obscuridad

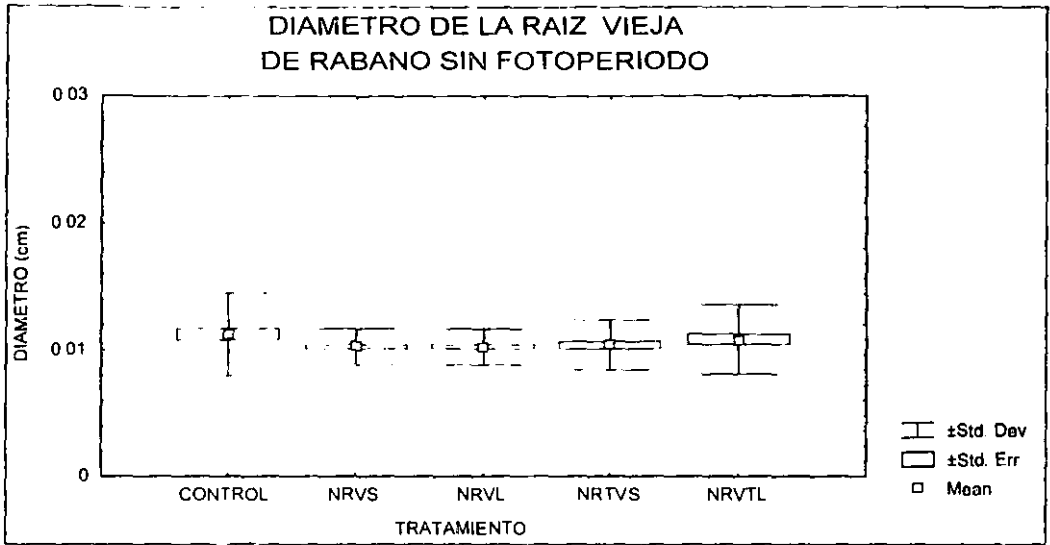
En la gráfica 12 el tratamiento de rábano viejo en un medio de tuberización líquido es el que presentó mayor longitud en las raíces (2.77 cm), por otro lado el cultivo que presentó la menor longitud fue el medio sólido con 1.17cm. Mientras que el grupo control tuvo una longitud radicular de 1.63 cm en promedio.

Al realizar el estadístico de ANOVA se obtuvo que  $F_{calculada} = 94.74$  siendo mayor a  $F_{245,4,0.05} = 2.41$ , concluyendo con esto que si hay diferencias significativas entre los tratamientos.

La prueba de Tukey demostró que el rábano viejo en el medio de tuberización líquido (NRRTL) y el rábano crecido en medio MS sólido fueron los tratamientos que mostraron mayor diferencia (1.60 cm). Cabe mencionar que el tratamiento NRRTL mostró diferencias con todos los tratamientos.



Respuesta del diámetro de las raíces en los tratamientos de Rábano viejo sin fotoperiodo.

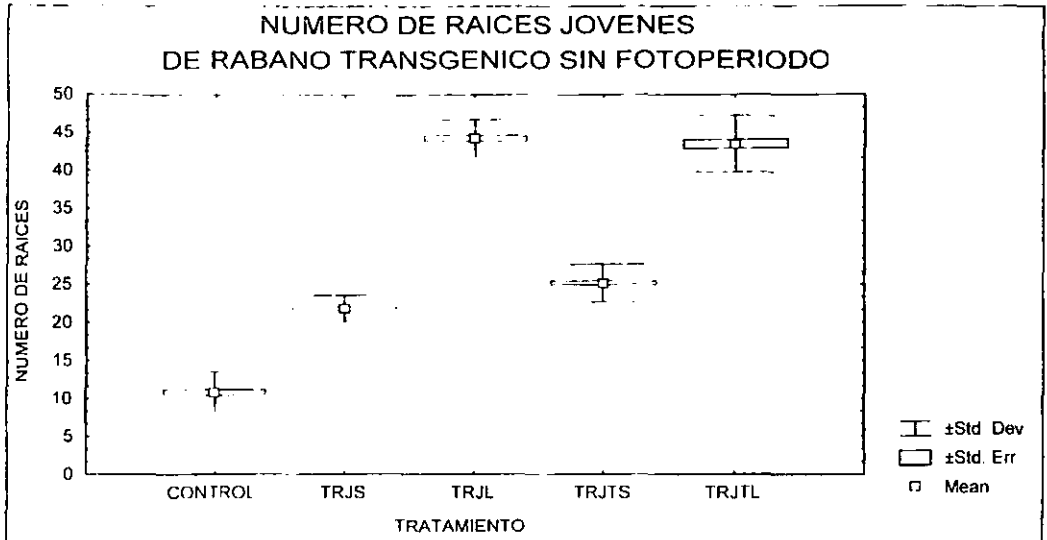


Gráfica 13.- CONTROL.-Es un cultivo obtenido del rábano comercial de un año de edad en invernadero el cual se cultivó sin reguladores de crecimiento. NRS - Cultivo de rábano viejo, en un medio sólido en obscuridad. NRL.- Cultivo de rábano viejo, en un medio líquido en obscuridad NRTS - Cultivo de rábano viejo, en un medio de tuberización sólido en obscuridad. NRTL - Cultivo de rábano viejo, en un medio de tuberización líquido en obscuridad

En la gráfica 13 el grupo control presenta mayor diámetro en las raíces (0.011cm). Por otro lado los grupos que presentaron el menor diámetro radicular fueron el cultivo de rábano viejo en un medio MS sólido (NRVS) y el cultivo de rábano viejo en un medio MS líquido (NRVL).

Para valorar si los tratamientos tenían diferencias se realizó el análisis estadístico de ANOVA, el cual demostró que el valor para la  $F_{calculada} = 1.83$  fue menor que el valor obtenido para la  $F_{245,4,0.05} = 2.41$  concluyendo con esto que NO hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Respuesta del número de raíces jóvenes de los tratamientos de Rábano transgénico sin fotoperiodo.



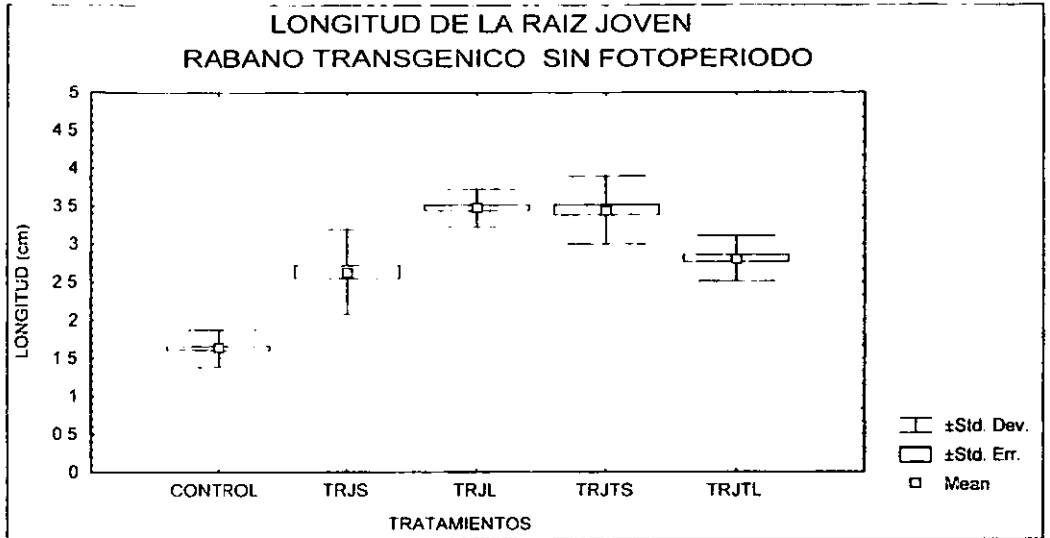
Gráfica 14.- CONTROL -Es un cultivo obtenido del rábano comercial de un año de edad en invernadero el cual se cultivó sin reguladores de crecimiento TRS - Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio sólido en obscuridad TRL - Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio líquido en obscuridad TRTS - Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio de tuberización sólido en obscuridad TRTL - Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio de tuberización líquido en obscuridad

En la gráfica 14 se observa que el rábano transgénico joven en un medio MS líquido es el que presentó mayor número de raíces (44.2), mientras que el grupo control mostró el menor número radicular (10.74).

Para conocer si las diferencias eran estadísticamente significativas se realizó el análisis de ANOVA obteniéndose el valor de  $F_{calculada} = 14044.80$  el cual fue mayor a  $F_{245,4,0.05} = 2.41$ , concluyendo con esto que si hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Por lo tanto se realizó la prueba de Tukey obteniendo que el rábano transgénico joven en el medio MS líquido (TRJL) y el grupo control fueron los que presentaron mayor diferencia en el número radicular (33.46), sin embargo éste medio (TRJL) no presentó diferencias con el rábano crecido en el medio de tuberización líquido (TRJTL), siendo ambos tratamientos los que presentaron los mejores crecimientos en éste grupo.

Respuesta de la longitud de las raíces en los tratamientos de Rábano transgénico joven sin fotoperiodo.



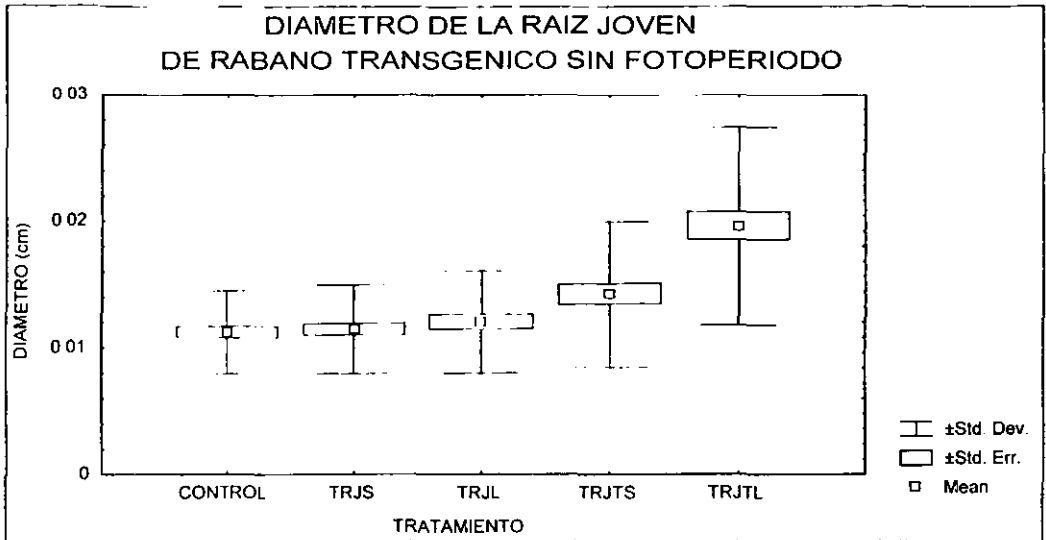
Gráfica 15.- CONTROL -Es un cultivo obtenido del rábano comercial de un año de edad en invernadero el cual se cultivó sin reguladores de crecimiento TRS - Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio sólido. TRL.- Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio líquido TRTS - Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio de tuberización sólido. TRTL - Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio

En la gráfica 15 se aprecia que el tratamiento de rábano transgénico joven en un medio MS líquido (TRJL) fue el que presentó mayor longitud de raíces (3.46 cm), mientras que el grupo control presentó la menor longitud radicular (1.63 cm).

Para determinar si el rábano transgénico joven presentó diferencias en la longitud al crecer en diferentes medios se realizó el análisis estadístico de ANOVA donde se obtuvo que  $F_{calculada} = 198.82$  siendo éste resultado mayor a  $F_{245,4 0.05} = 2.41$ , concluyendo con esto que si hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Para saber entre cuales tratamientos de encontraban las diferencias se realizó la prueba de Tukey, la cual determinó que el rábano transgénico joven en medio MS líquido (TRJL) y el grupo control fueron los que presentaron la mayor diferencia (1.83 cm).

Respuesta del diámetro de las raíces jóvenes en los tratamientos de Rábano transgénico sin fotoperiodo.

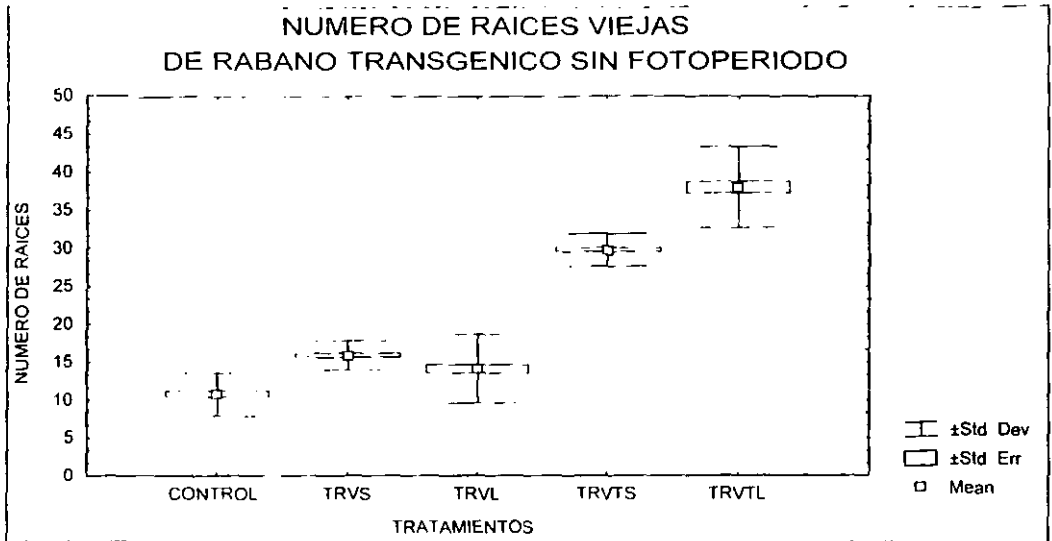


Gráfica 16.- CONTROL.-Es un cultivo obtenido del rábano comercial de un año de edad en invernadero el cual se cultivó sin reguladores de crecimiento. TRS - Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio sólido en obscuridad. TRJL - Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio líquido en obscuridad. TRJTS.- Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio de tuberización sólido en obscuridad. TRJTL.- Cultivo de rábano transgénico joven, en un medio de tuberización líquido en obscuridad.

En la gráfica 16 el tratamiento de rábano transgénico joven en un medio de tuberización líquido (TRJTL) fue el que presentó el mayor diámetro de raíces (0.020 cm), y el grupo control mostró el menor diámetro radicular (0.011 cm).

Para conocer si las diferencias eran estadísticamente significativas se realizó el análisis estadístico de ANOVA donde se obtuvo que  $F_{calculada} = 23.25$  siendo mayor a  $F_{245,4,0.05} = 2.41$ , concluyendo con esto que si hay diferencias significativas entre los tratamientos. Al aplicar la prueba de Tukey se obtuvo que el rábano transgénico joven en el medio de tuberización líquido (TRJTL) y el grupo control fueron los que demostraron la mayor diferencia (0.0084cm). Además el rábano TRJTL tuvo diferencias con todos los tratamientos.

Respuesta del número de raíces para el Rábano transgénico viejo sin fotoperiodo.



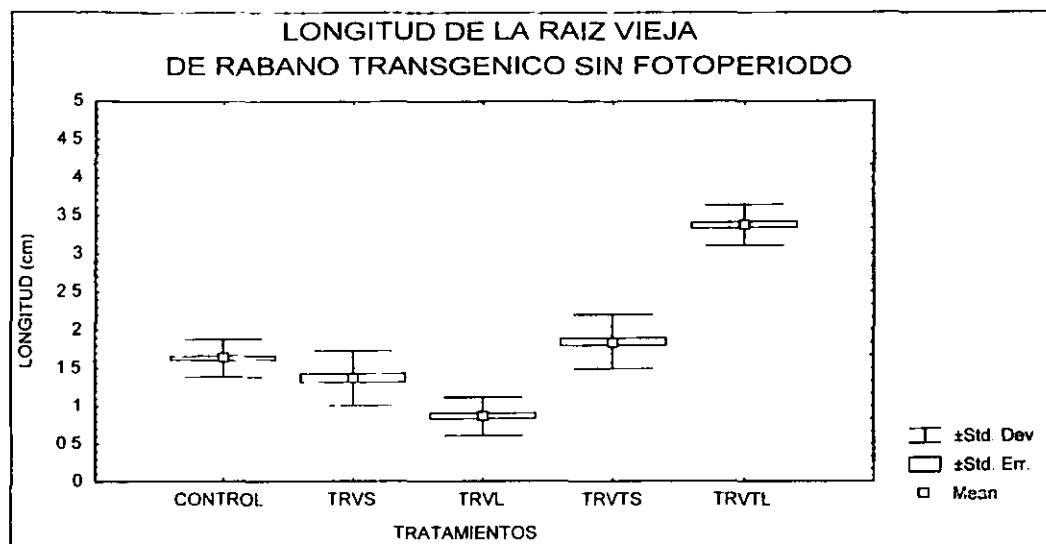
Gráfica 17.- CONTROL - Es un cultivo obtenida del rábano comercial de un año de edad en invernadero el cual se cultivó sin reguladores de crecimiento TRS - Cultivo de rábano transgénico viejo, en un medio sólido en obscuridad TRL - Cultivo de rábano transgénico viejo, en un medio líquido en obscuridad TRTS - Cultivo de rábano transgénico viejo, en un medio de tuberización sólido en obscuridad TRTL - Cultivo de rábano transgénico viejo, en un medio de tuberización líquido en obscuridad

En la gráfica 17 se muestra que el rábano viejo en un medio de tuberización líquido fue el que presentó mayor número de raíces (38.04), y que el grupo control tuvo el menor número radicular (10.74).

Para valorar si los diferentes tratamientos presentaban diferencias estadísticamente significativas se realizó el análisis estadístico de ANOVA, obteniéndose que  $F_{calculada} = 521.13$  siendo mayor éste resultado que el obtenido para la  $F_{245,4,0.05} = 2.41$ , concluyendo con esto que si hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Para saber entre cuales tratamientos se encontraban las diferencias se realizó la prueba de Tukey, la cual determinó que el rábano transgénico viejo en el medio de tuberización líquido (TRVTL) y el grupo control presentaron la mayor diferencia radicular (27.3). Además el rábano TRVTL presentó diferencias con todos los tratamientos probados para éste grupo.

Respuesta de la longitud de raíces viejas, en los tratamientos de Rábano transgénico sin fotoperiodo.



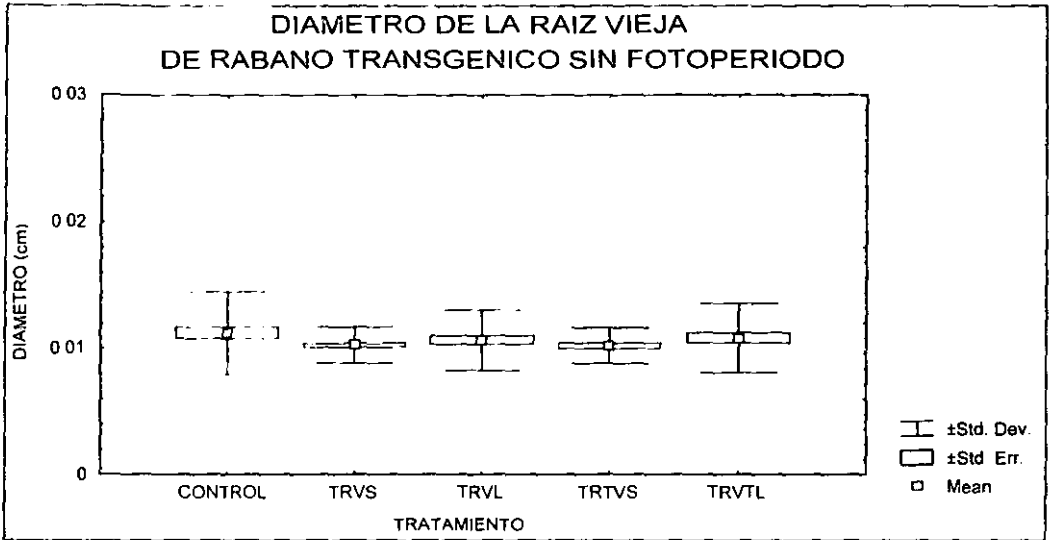
Gráfica 18.- CONTROL.-Es un cultivo obtenido del rábano comercial de un año de edad en invernadero le cual se cultivó sin reguladores de crecimiento TRS.- Cultivo de rábano transgénico viejo, en un medio sólido en oscuridad. TRL - Cultivo de rábano transgénico viejo, en un medio líquido en oscuridad. TRTS - Cultivo de rábano transgénico viejo, en un medio de tuberización sólido en oscuridad TRTL - Cultivo de rábano transgénico viejo, en un medio de tuberización líquido en oscuridad

En la gráfica 18 podemos observar que el tratamiento de rábano transgénico viejo en un medio de tuberización líquido desarrollo la mayor longitud radicular en promedio (3.38 cm) mientras que el tratamiento de rábano transgénico viejo en un medio MS líquido (TRVL) fue el que presentó la menor longitud radicular (0.86 cm).

Al realizar el análisis estadístico de ANOVA se obtuvo que  $F_{calculada} = 424.14$  siendo mayor a  $F_{245,4,0.05} = 2.41$ , concluyendo con esto que si hubo diferencias significativas entre todos los tratamientos.

Se efectuó la prueba de Tukey, la cual demostró que el rábano transgénico viejo en medio de tuberización líquido y el medio MS líquido fueron los tratamientos que presentaron mayor diferencias, en cuanto a la longitud (2.51 cm). Cabe mencionar que todos los tratamientos demostraron diferencias significativas entre sí.

Respuesta del diámetro de las raíces en los tratamientos de Rábano transgénico viejo sin fotoperiodo.



Gráfica 19.- CONTROL -Es un cultivo obtenido del rábano comercial de un año de edad en invernadero el cual se cultivó sin reguladores de crecimiento. TRS.- Cultivo de rábano transgénico viejo, en un medio sólido en oscuridad. TRL.- Cultivo de rábano transgénico viejo, en un medio líquido en oscuridad. TRTS.- Cultivo de rábano transgénico viejo, en un medio de tuberización sólido en oscuridad TRTL - Cultivo de rábano transgénico viejo, en un medio de tuberización líquido en oscuridad

En la gráfica 19 se valora que el grupo control es el que presentó mayor diámetro de raíces (0.011 cm) y que los grupos TRTVS y TRVTL fueron los que mostraron el menor diámetro radicular (0.010 cm).

Para indicar si los tratamientos de la gráfica 19 presentaban diferencias estadísticas, fue realizado el análisis de ANOVA, el cual demostró que el valor para  $F_{calculada} = 1.81$  siendo menor al valor obtenido en tablas  $F_{245,4,0.05} = 2.41$ , concluyendo con esto que NO hay diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.

#### 5.4.- Actividad de las peroxididasas

Actividades de las enzimas peroxidasa para el rábano comercial.

Tipo de cultivo.	Actividad específica en la raíz (U/proteínaT)	Actividad específica en el medio (U/proteína T)	Actividad total (U/ proteína T)
Control	9.43		9.43
Con fotoperiodo	NRL	12.35	31.76
	NRTL	8.93	38.13
	NRJL	9.03	13.76
Sin fotoperiodo	NRJTL	13.36	20.16
	NRVL	4.27	4.59
	NRVTL	11.27	14.97

Tabla 1.- Corresponde a los resultados de la actividad enzimática de las peroxididasas para el rábano comercial. En condiciones de fotoperiodo y sin el, para los diferentes cultivos. También fueron realizadas las mediciones en los medios líquidos para así evaluar la cantidad de enzimas excretadas al medio por los cultivos radiculares.

NRL.- Cultivo de rábano comercial en un medio líquido. NRTL.-Cultivo de rábano comercial en un medio de tuberización líquido. NRJL.- Cultivo de rábano comercial joven en un medio líquido. NRJTL.- Cultivo de rábano comercial joven en un medio de tuberización líquido. NRVL.-Cultivo de rábano comercial viejo en un medio líquido. NRVTL.- Cultivo de rábano comercial viejo en un medio de tuberización.

U.- Unidad de peroxidasa.- $\mu$ M de guayacol oxidado / minuto en un mililitro

Actividad T.- Actividad total cuantificada por el método de Bradford.

Actividad específica.- Unidades de actividad enzimática por unidad de muestra, la unidad de muestra se expresó como proteína total.

Actividad total - Actividad específica obtenida de la raíz más la actividad específica en el medio de cultivo líquido.

En los cuadros remarcados en color verde de la tabla 1, se muestran los cultivos que produjeron mayor actividad enzimática:

NRJTL (Rábano comercial joven en obscuridad en medio de tuberización líquido) fue el que presentó mayor actividad enzimática en el tejido (13.36 U/prot.total). Mientras que el cultivo que excretó la mayor cantidad de peroxididasas fue NRTL (Rábano comercial joven con fotoperiodo en un medio de tuberización líquido) registrando una actividad de 29.2 U/Prot total.

El cultivo que tuvo mayor actividad de peroxididasas totales fue NRTL (Rábano comercial joven con fotoperiodo en un medio de tuberización líquido) presentando 38.13 U/Prot total.

Todos los cultivos rebasaron la actividad de peroxididasas obtenidas por el grupo control, con excepción del cultivo viejo sin fotoperiodo en un medio MS líquido.



Actividades de las enzimas peroxidasa para el rábano transgénico.

	Tipo de cultivo.	actividad específica (U/proteínaT)	Actividad específica en el medio	Actividad total
Con fotoperiodo	Control	18.48		18.48
	TRL	13.95	23.79	37.74
	TRTL	24.40	17.58	<b>41.98</b>
	TRJL	7.43	12.55	19.98
Sin fotoperiodo	TRJTL	5.26	0.14	5.4
	TRVL	7.35	0.32	7.67
	TRVTL	5.69	0.0	5.69

Tabla 2.- Muestra los resultados de la actividad enzimática de las peroxidasa para el rábano transgénico en condiciones de fotoperiodo y sin el, para los diferentes cultivos. Se realizó la cuantificación de la actividad enzimática en los medios líquidos para evaluar la cantidad de enzimas excretadas al medio.

TRL - Cultivo de rábano transgénico en un medio líquido. TRTL -Cultivo de rábano transgénico en un medio de tuberización líquido. TRJL.- Cultivo de rábano comercial joven en un medio líquido. TRJTL.- Cultivo de rábano transgénico joven en un medio de tuberización líquido. TRVL -Cultivo de rábano transgénico viejo en un medio líquido. TRVTL - Cultivo de rábano transgénico viejo en un medio de tuberización viejo.

U.- Unidad de peroxidasa -µM de guayacol oxidado / minuto en un mililitro

Proteína T.- Proteína total cuantificada por el método de Bradford.

Actividad específica - Unidades de actividad enzimática por unidad de muestra, la unidad de muestra se expresó como proteína total.

Actividad total.- Actividad específica obtenida de la raíz más la actividad específica en el medio de cultivo líquido.

En los cuadros remarcados se muestran los cultivos que produjeron mayor actividad enzimática, el TRJTL (Rábano transgénico joven con fotoperiodo en un medio de tuberización líquido) fue el que presentó mayor actividad enzimática en el tejido (24.4 U/prot.total). El cultivo que excretó la mayor cantidad de peroxidasa fue TRL (Rábano transgénico joven con fotoperiodo en un medio líquido) con 23.79 U/Prot. Total.

El cultivo que presentó mayor actividad total de peroxidasa fue TRTL (Rábano transgénico joven con fotoperiodo en un medio de tuberización líquido) con una actividad de 41.98 U/Prot total. Este cultivo también fue el que presentó mayor actividad de peroxidasa comparándolo con los tratamientos del rábano comercial.

## VI.-ANÁLISIS

Los resultados correspondientes a la comprobación de la transformación la confirmaron, ya que se pudo observar que el cultivo de rábano transgénico reaccionó positivamente para las dos características morfológicas de transformación evaluadas:

Para la primera de ellas, el crecimiento como raíz peluda, se verificó la transformación inducida por el plásmido Ri de Agrobacterium rhisogenes (Saitou, 1991) ya que éste organismo fue nombrado así precisamente por favorecer el crecimiento radicular secundario del vegetal que infecta (fig. 1 b).

En estos resultados también se pudo observar la diferencia morfológica entre los cultivos de rábano comercial (fig 1a) y de rábano transgénico (fig.1b), donde el rábano comercial presentó una raíz delgada, lisa mientras que el rábano transgénico presentó una raíz delgada con numerosas raíces adventicias, como reportan Saitou y sus colaboradores en 1991 y Pagara y col. 1993.

La segunda característica fue el crecimiento radicular en ausencia de fitoreguladores, en la fig.2 se muestra la comparación de los cultivos comercial (fig. 2 a) y transgénico en la (fig. 2b) en donde el rábano transgénico mostró un rápido crecimiento radicular, lo que concuerda con el reporte de Parkinson en 1990; Liu y col en 1999; mientras el cultivo de rábano comercial desarrolló un número reducido de raíces, estas diferencias en la respuesta ayudaron a verificar la transformación.

Hay que tomar en cuenta que estos resultados se obtuvieron cualitativamente, ya que los medios para realizar las pruebas cuantitativas como el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los análisis por hibridación del ADN (Slot blotting y Southern blotting), y el ensayo histoquímico con  $\beta$ -glucuronidasa no estaban al alcance de este trabajo.

### RESPUESTA DE LOS DIFERENTES INÓCULOS.

Se realizó el cultivo de diferentes inóculos, los cuales fueron: tallo, peciolo y hoja, para obtener el mejor porcentaje de respuesta. Estos resultados se pueden observar en la grafica 1.

Los inóculos de tallo y peciolo tuvieron un porcentaje bajo de respuesta del 20%, para ambos cultivos, por lo que se descartó el cultivo de éstos inóculos para la propagación masiva.

El mejor porcentaje de respuesta en cultivo de tejidos vegetales se obtuvo con el inóculo de hoja, que fue del 80 % para ambos cultivos, siendo así el más conveniente para la propagación masiva del rábano comercial y del rábano transgénico.

El inóculo de hoja además de su alto porcentaje de respuesta, presentó morfogénesis directa de raíz (figura 3) lo cual favoreció la investigación, ya que se disminuyó la manipulación de los cultivos y se ahorró así la fase III de la micropropagación, donde se produce la generación de raíz por medio de cultivo de tejidos vegetales como reportó Murashige (1974).

Una vez realizada la verificación se obtuvo la seguridad para emplear los cultivos transgénicos y comerciales, los cuales fueron micropropagados para de esta forma obtener suficiente cantidad de raíces, las que posteriormente fueron divididas en los diferentes medios y condiciones de fotoperiodo.

A continuación se muestran los medios que proporcionaron la mejor producción de rábano comercial y transgénico para las diferentes condiciones de cultivo.

#### Rábano comercial.

Condiciones de fotoperiodo	Condiciones del cultivo	Número de raíces	Longitud radicular (cm)	Diámetro radicular (cm)
Con fotoperiodo	Joven	MS líquido 31.7	Tub. líquido 5.056	Tub. Líquido 0.049
Sin fotoperiodo	Joven	MS líquido 32.66	MS líquido 4.76	Tub. Líquido 0.048
Sin fotoperiodo	Viejo	MS líquido 22.06	Tub. Líquido 2.77	No hay diferencias

Tabla 3.- Muestra que el cultivo joven en medios líquidos fue el más adecuado para la producción de rábano comercial.

#### Rábano transgénico.

Condiciones de fotoperiodo	Condiciones del cultivo	Número de raíces	Longitud radicular	Diámetro radicular
Con fotoperiodo	Joven	MS líquido 60.56	Tub. líquido 5.018	Tub. Líquido 0.051
Sin fotoperiodo	Joven	MS líquido 44.2	MS líquido 3.46	Tub. Líquido 0.019
Sin fotoperiodo	Viejo	Tub. líquido 38.04	Tub. Líquido 3.37	No hay diferencias

Tabla 4.- El cultivo de rábano joven con fotoperiodo en medios líquidos fue el que presentó la mejor condición, para la producción de raíz de rábano transgénico.

En los diferentes tratamientos probados, los cultivos desarrollados en medios líquidos tanto MS como de tuberización fueron los que presentaron un mayor desarrollo de raíz (Tabla 3 y 4). Estos medios favorecieron el desarrollo radicular, ya que la viscosidad en el medio disminuyó por la carencia de agar, aumentando así el potencial hídrico (William, 2000). Al aumentar el potencial hídrico en condiciones de obscuridad las raíces no se vieron afectadas por las fuerzas hidrotropicas y geotropicas lo que generó el crecimiento característico de las raíces en obscuridad, esto se refiere a que las raíces crecieron bien sobre la superficie del medio formando una "bola" de raíces, debido a que algunas de ellas, las de la superficie presentaron geotropismo negativo, en cambio las raíces con fotoperiodo en medios líquidos sí se vieron afectadas por el geotropismo en una forma positiva (Takahashi, 1991), así como por el fototropismo negativo, estos movimientos de la raíz causaron diferencias que fueron apreciadas en el crecimiento de los cultivos, sin embargo estas diferencias en el crecimiento, en condiciones con fotoperiodo no afectaron la cantidad, ni el tamaño radicular; ya que los mejores crecimientos se dieron en condiciones con fotoperiodo, como lo muestran las tablas 3 y 4.

Otro factor importante aunado a la carencia de agar y el aumento del potencial hídrico, fue la agitación constante en el medio, lo que favoreció la disponibilidad de oxígeno, por lo que fue provocada la formación y elongación radicular (Verslues, 1998), ésto se apreció en los datos donde se cuantificaron el número y longitud de raíces de los diferentes cultivos. Al permanecer los tejidos en agitación constante, permitieron un nivel de aireación mayor que los que se encontraron en cultivos sólidos, mejorando su crecimiento como se observa en las gráficas de los resultados. Esta agitación les confirió mayor velocidad en la transferencia de oxígeno; y por lo tanto al tener mayor oxigenación se favoreció el crecimiento celular así como la producción de metabolitos celulares (Payne G., 1992), lo cual concuerda con los resultados obtenidos para la actividad de peroxidasas (Tabla 1, 2). La agitación en el medio también favoreció la diferenciación celular, y la respuesta morfogenética (rizogénesis). La formación de raíces en los medios líquidos predominantemente ocurre de una forma continua y ascendente tanto en condiciones de fotoperiodo como de obscuridad siendo semejante a lo reportado por Kessell (1972).

El medio de tuberización resultó el más conveniente para la producción de raíces con diámetros mayores, exceptuando los cultivos de raíces viejas las cuales no tuvieron diferencia estadística en su crecimiento; los cultivos de rábano joven con fotoperiodo y en obscuridad presentaron un mayor diámetro (cuatro veces más que el control), demostrando que fue un medio que favoreció el incremento en el grosor de la raíz. El cultivo de rábano transgénico joven en medio líquido tuvo un buen crecimiento en condiciones de fotoperiodo con un diámetro de cinco veces más que el control, en cambio en condiciones de obscuridad el diámetro se desarrolló poco considerando el tiempo que comprendió este trabajo. De un modo general el medio de tuberización líquido favoreció la producción de raíces más gruesas.

El medio de tuberización líquido favoreció también el crecimiento de las líneas viejas observándose un aumento en la longitud y el número radicular.

Los cultivos jóvenes tuvieron una mejor respuesta que los viejos, ya que presentaron una actividad meristemática mayor y por lo tanto altas velocidades de división celular, en cambio los cultivos viejos presentaron una respuesta baja en todos los parámetros cuantificados, esto posiblemente se deba a la presencia de mayor cantidad de etileno, ya que se ha demostrado que éste puede inhibir la elongación y el enraizamiento para varios genotipos del género (Clark, 1999; Biddington, 1992) o por que un gran número de células se encontraban senescentes, ya que aunado al bajo crecimiento radicular presentaron cambios en la pigmentación del tejido lo que concuerda con los estudios realizados por Kadioglu en 1997.

Actividad de peroxidasas en las mejores condiciones de cultivo de tejidos.

La actividad de peroxidasas para el rábano comercial joven con fotoperiodo, fue de 12.35 U de actividad específica para el medio M.S. líquido, y el medio de tuberización líquido fue el que excretó mayor cantidad de peroxidasa al medio que sumada a la obtenida en el tejido es el medio que presentó mayor actividad de todos los cultivos del rábano comercial (38.13 U).

Al cuantificar las peroxidasas para el rábano comercial joven en obscuridad, se encontró que el medio de tuberización líquido obtuvo una actividad específica de 13.36 U, siendo esta condición también la que excretó mayor cantidad de peroxidasas al medio.

El rábano comercial viejo sin fotoperiodo, obtuvo 11.37 U de actividad específica para el medio de tuberización líquido, siendo la condición que excretó mayor cantidad de peroxidasas al medio.

La actividad enzimática en el rábano transgénico joven con fotoperiodo fue de 24.40 U de actividad específica para el medio tuberización líquido, mientras que en el medio de M.S. líquido se excretó la mayor cantidad de peroxidasas al medio. Sin embargo el medio de tuberización líquido fue el que presentó mayor actividad de peroxidasas totales (41.98 U) de todos los cultivos de rábano transgénico.

Para el rábano transgénico joven sin fotoperiodo, la actividad fue de 7.43 U para el medio M.S. líquido, siendo en ésta condición donde los cultivos excretaron la mayor cantidad de peroxidasas al medio.

La actividad de peroxidasas para el rábano transgénico viejo sin fotoperiodo, en cultivo de tejidos vegetales fue muy baja.

La mejor condición para la producción de peroxidasas, comparando los dos cultivos de rábano en sus diferentes condiciones fue el cultivo de rábano transgénico con fotoperiodo, en un medio de tuberización líquido.

## VII.-CONCLUSIÓN

El inóculo de hoja fue el más adecuado para la propagación masiva de raíz, para ambos cultivos.

Los mejores medios para ambos cultivos fueron: los cultivos líquidos y los de tuberización líquidos

Las mejores condiciones en cultivo de tejidos vegetales para la producción de raíz de rábano comercial fueron cultivos jóvenes sin fotoperiodo en medio MS líquido para obtener el mayor número de raíces y el medio de tuberización con fotoperiodo para obtener mayor longitud y diámetro de las mismas.

Mientras que para el rábano transgénico los medios más favorables fueron, el medio MS líquido con fotoperiodo para la mayor cantidad de raíces tanto en número como en longitud, y el medio de tuberización líquido con fotoperiodo favoreció el engrosamiento radicular, siendo éstas las mejores condiciones de producción de rábano.

El cultivo con mayor actividad total de peroxidasas fue el de rábano transgénico joven con tratamiento de fotoperiodo crecido en medio de tuberización líquido.

## VIII.-RECOMENDACIONES

Para trabajos posteriores donde se requiera producir biomasa de rábano, se recomienda trabajar con raíces de 8 semanas, sin fotoperiodo en un medio MS líquido. Para la producción de peroxidasas se recomienda trabajar con raíces jóvenes en medio de tuberización con fotoperiodo (16 hrs luz / 8 hrs oscuridad)

Ahora bien si se desea producir biomasa de rábano transgénico, se recomienda trabajar con raíces jóvenes, con fotoperiodo en un medio MS líquido. Y para la producción de peroxidasas se recomienda trabajar con raíces jóvenes en medio de tuberización con fotoperiodo (16 hrs luz / 8 hrs oscuridad)

Para la producción de peroxidasas a una escala mayor se podría intercalar los cultivos de raíces en diferentes medios, esto es puede iniciarse el cultivo en un medio M.S. líquido con fotoperiodo, y después cambiarlo a un medio de tuberización líquido con fotoperiodo.

IX.- APENDICE.

Medio de Murashige y Skoog (1962)

COMPUESTO	mg/L
SALES MAYORES	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8
SALES MENORES	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	8.5
KI	0.88
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.9

Compuestos adicionados al medio de rábano.

RÁBANO COMERCIAL		RÁBANO TRANSGÉNICO	
VITAMINAS	Mg/L	VITAMINAS	Mg/L
GLICINA	2	GLICINA	2
Ac. NICIOTINICO	0.5	Ac. NICIOTINICO	0.5
PIRIDOXINA (HCl)	0.5	PIRIDOXINA (HCl)	0.5
TIAMINA (HCl)	1.0	TIAMINA (HCl)	1.0
MIO-INOSITOL	100	MIO-INOSITOL	100
ANA	1	MES	0.976 g/L
CINETINA	0.1	Ac. ASCORBICO	0.15 g/L
SACAROSA	30 g/L	SACAROSA	30 g/L
AGAR	8 g/L	AGAR	8 g/L
PH	5.8		



## MEDIO DE TUBERIZACIÓN (Ortiz, 1987)

Sales mayores y menores del MS.

Compuestos adicionados.

COMPUESTO	Mg/L
MIO-INOSITOL	100
TIAMINA	0.4
CINETINA	3.5
SACAROSA	60.0 g/l
AGAR	7 g/L

Después de inducir la tuberización, agregar

Ac. GIBRERILICO	3-6 mg/L
-----------------	----------

## OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO.

La obtención del extracto se llevó a cabo en una solución de regulador de fosfatos 10 mM a un pH de 6.2.

El procedimiento que se siguió fue:

Primeramente se obtuvo el peso fresco de la raíz (en mg) de las líneas que permanecieron en cultivo por ocho semanas. Posteriormente se redujo el tejido vegetal, en un mortero el cual contenía regulador de fosfatos 10mM, pH 6.2, el tejido y el regulador se mantuvieron en una relación de 1 mg de tejido por 3 ml de regulador. Todo éste proceso se llevó a cabo en un baño de hielo a 4° C.

El extracto macerado se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min.

Se colectó el sobrenadante y se midió el volumen colectado, una vez realizado esto se dividió en alícuotas las cuales se mantuvieron en refrigeración.

De las alícuotas en refrigeración se tomaron los mililitros necesarios para cuantificar, la cantidad de proteínas, y la actividad enzimática de las peroxidasas.

Determinación de proteínas por el método de Bradford, (García, 1998).

El proceso se realizó preparando el reactivo de Bradford con las siguientes soluciones:

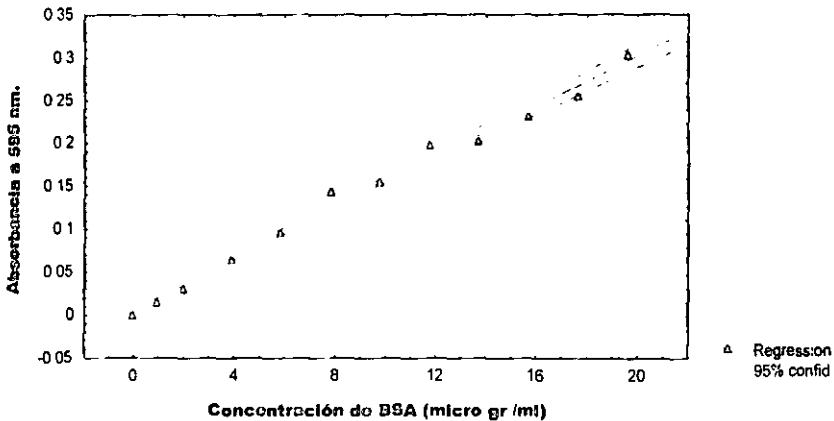
Primeramente se preparó la solución de BSA (Albúmina de suero bovino) 2 mg por ml en NaCl<sub>2</sub> a 0.15 M, que fue la proteína estándar. Acto seguido se preparó el reactivo de Bradford. Disolviendo 100 mg del colorante Azul brillante de Coomassie G-250 ,en 50 ml de etanol al 95 %.Al cual se adicionaron 100 ml de ácido fosfórico al 85 % (w / v). Hasta completar así una solución de un litro.

Durante el procedimiento se realizó una curva estándar con concentraciones de BSA de 0 a 20 miligramos por microlitro y se ajusto el volumen a 100 microlitos con NaCl<sub>2</sub>. Después se agregaron 5 mililitros de reactivo de Bradford preparado como se describió anteriormente. Esta mezcla de reacción se leyó a una absorbancia de 595 nm; después de 10 minutos de agregado el colorante y antes de una hora de iniciada la reacción.

Cuantificación de proteínas

Absorbancia contra concentración de proteína.

Correlación:  $r = 0.99478$



Para obtener la proteína total se interpola la abs. de la muestra problema obtenida experimentalmente en la curva patrón que se muestra arriba. Es una gráfica lineal la cual se expresa matemáticamente por medio de la ecuación de la línea recta ( $Y=mx+b$  donde  $m$  es la pendiente o ángulo de inclinación y  $b$  es la ordenada de origen) y representa una proporcionalidad directa por lo cual es fácil predecir, interpolar y extrapolar valores como fueron la absorbancia obtenida experimentalmente. Con estos valores interpolados se pudo obtener la concentración de proteína en microgramos por mililitro, este dato se introduce en la siguiente fórmula para obtener la proteína total.

$$\text{Proteína total} = \frac{\text{Concentración obtenida (Volumen total)}}{\text{Volumen de la alícuota}}$$

RECIBIDO EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

**Determinación de la actividad de las peroxidasas. (Rao, et al. 1995).**

La determinación de las enzimas peroxidasas se realizó preparando primeramente las siguientes soluciones

**Solución de Peroxidasa.** Se disolvieron 2mg de peroxidasa extracto crudo SIGMA P-8000, extracto crudo en 10 mililitros de regulador de fosfatos (w / v).

**Solución de Guayacol.** Se realizó una solución al 1% (v / v)

**Solución de Peróxido de hidrógeno.** Se utilizó una solución al 0.03 % de peróxido de hidrógeno.

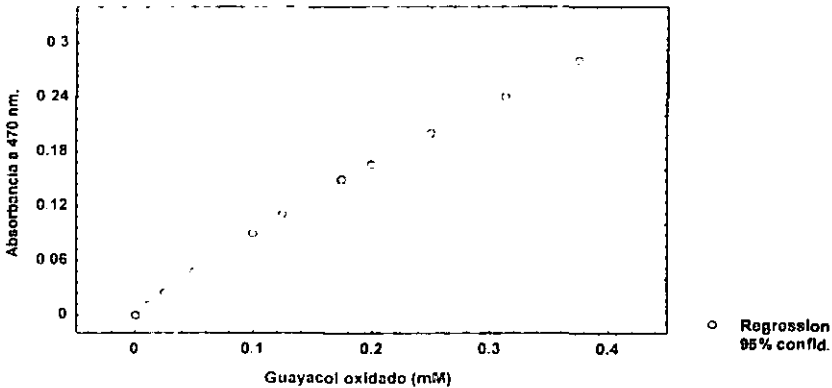
**Regulador de fosfatos** Se realizó una solución reguladora de fosfatos, a una concentración de 10 mM y un pH de 6.2.

Durante el procedimiento se realizó una curva estándar de peroxidasas, con 320 µl de peroxidasas a la cual se adicionaron 500 µl de guayacol. A la mezcla anterior se le adiciono de 0 a 0.375 mM de peróxido de hidrógeno, y se completo un volumen de reacción de 8 ml con regulador de fosfatos 10 mM a pH 6.2, y fue homogeneizando mediante agitación suave. La reacción se incubó a 28 ° C. Y el color que se desarrolló, fue leído a 470 nm en un espectrofotómetro.

Actividad de peroxidasa cuantificada por la oxidación del guayacol por minuto.

**Curva estándar de la actividad de peroxidasas.**

Correlación r = 0.99747



Para obtener los milimoles de guayacol oxidado se interpola la abs. de la muestra problema obtenida experimentalmente en la curva patron que se muestra arriba. Es una gráfica lineal y se expresa matemáticamente por medio de la ecuación de la línea recta (Y=mx+b ). Con estos valores interpolados se pudo obtener la concentración de guayacol en milimoles de guayacol oxidado por minuto en un mililitro que representó a las unidades enzimáticas, este dato se introduce en la siguiente formula para obtener la Actividad específica.

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Unidades} / \mu\text{g de proteína}}{\text{Proteína total.}}$$

## X.- BIBLIOGRAFÍA

1. Aitken, M.D. Massey, I.J. Chen, T. Heck, P.E. (1994). Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. *Water Research*. 28 (9):1879-1889
2. Alcazar y Moreno, 1957. Fitología gráfica (Herbario naturista). editorial Dossat. España.
3. Alfermann, A.W. Petersen, M. (1995). Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 43:199-205.
4. Amador Sánchez Ángel, 2000 "El universal", Estados. 5 de Agosto de 2000. Pag. B9.
5. Arellano G. J. (1995) Establecimiento de sistemas de cultivo de raíces transformadas para la producción de metabolitos de importancia económica. Tesis doctoral I.P.N.; E.N.C.B. México.
6. Bartone-Roxa, E. Eriksson, H. (1994). Expression of a natural horseradish peroxidase in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 37 (2):133-142.
7. Biddington N. L. (1992) The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation*. 11: 173-187.
8. Blinkousky, E.M. McEldoon, J.P. Arnold, J.M. Dordick, J.S. (1994). Peroxidase-catalyzed polymerization and depolymerization of coal in organic solvents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 49 (2): 153-164.
9. Brewer S, Kendall (1999) *Biotecnología aplicaciones para alimentos vegetales*. Consejo latinoamericano de información alimentaria.
10. Bu'Lock, B, Kritiansen, (1991). Biotecnología básica. Editorial Acribia. España. Pp.557.
11. Calderón-Baltierra (1994) Changes in peroxidase activity during root formation by *Eucalyptus globulus* shoot raised in vitro. *Plant peroxidase Newsletter* No. 4 .Sep.: 27-29.
12. Campa A. (1991) Biological roles of plant peroxidase: Known and potencial function. En Euerse and Grishan. Peroxidases in chemistry and biology. CRC press. Boca Raton. pp 26-43
13. Cella R. and Carbonera D (1997). Peroxidases and morphogenesis. *Plant Peroxidase Newsletter* No 10. 24-29
14. Clark G. Gubrium K. Barret E. Terril A. Nell and Klee J.(1999) Root formation in ethylene-intensitue plants. *Plant Physiology* 121: 53-60.
15. Cordewener, J. Booy, H. Van -Der-Zandt, H. Van-Engelen, F. Van-Kammen-A, De-Vries, S. (1991). Tunicamycin-inhibited carrot somatic embriogenesis can be restores by secreted cationic peroxidases isoenzymes. *Planta (Heidelberg)*. 184(4):478-486.
16. Cortinas, E: H. (1997) Perspectivas de la biotecnología y los marcadores moleculares en el desarrollo de la agricultura en México. *Ciencia*. 48(3):51-56.
17. Cuevas, R. (1991). Obtención y purificación de peroxidasa de *Armoracia laphatifolia* (Gilib). Estudio comparativo de las isoenzimas de tuberculo y tejido calloso. Tesis. E. N. C. B., I. P. N., México.

18. Chatterjee P., Golwalkar S. and Mukundan U (1999) Peroxidase production from *cucumis melo* hairy root cultures Plant Peroxidase Newsletter No. 13
19. Dean J.F.D.; Raja Sterjiades and Karl-Erik L. Eriksson (1994) Purification and characterization of an anionic peroxidase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell suspension cultures. *Physiologia Plantarum* 92 : 233-240
20. Dec, J. Bollag, J.M. (1994). Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols *Biotechnology and Bioengineering*. 44(9): 1132-1139
21. Doerge, D.R. Cooray, N.M. Brewster, M.E. (1991). Peroxidase-catalyzed S-oxygenation: Mechanism of oxygen transfer for lactoperoxidase *Biochemistry*. 30(37):8960-8964
22. Ducreux, G ; L. Rossignol, y M. Rossignol (1984). La patata. *Mundo Científico* 57. 6:408 - 423.
23. Esaka M. Nishitani I. Fukui H. Suzuki K. (1989) Simulation of ascorbate oxidase secretion from cultured pumpkin cell by divalent cation. *Phytochemistry*. 28: 2655-2658.
24. Esnault R. and Chibbar R.N (1997) Peroxidases and plant defence. *Plant Peroxidase newsletter* No. 10 7-14
  
25. Ferrer, I; Dezotti, M; Duran, N. (1991). Decolorization of Kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidases and horseradish peroxidases. *Biotechnology letters*. 13 (8): 577-582.
26. Font Quer P. (1973). Plantas medicinales. Editorial Labor. España. Pag. 251-255.
27. Ford M.; and Silbes (1988) Photosynthesis and other traits in relation to chloroplasts nuber durin soy bean leaf senescence. *Plant Physiology*. 86: 108-111.
28. Fry, S.C. (1986) Cross-linking of matrix polimers in the growing cell wall of Angiosperms. *Ann. Rev. Plant Physiology*. 37. 165-186.
29. Gacesa P; Hubble J.(1990) Tecnología de las enzimas. España. Editorial ACRIBA. PP.206
30. García A.;Vázquez D. (1998) Cuantificación de proteínas: una revisión. *Biotecnología*. 3: 77-88.
31. Henry S. Koczan J. and Richardson, T. (1974). *Journal Biotechnol Bioengineering*. 16: 289-291.
32. Holst J., G. Bauw, K. Gjesing Welinder. (1998). Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in polar xylem. *Plant Physiology* 118: 125-135.
33. Huystee R.B. (1987) Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Ann.Rev. Plant Physiology*. 38: 205-219.
34. Huystee R.B. Van and Esnault R. (1995) reflections on peanut peroxidase regulation of growth. *Plant peroxidasa newsletter* No. 6, Sept. 8-10
  
35. Jiménez-Aparicio, G. Gutiérrez-López. M. Rodríguez-Monroy y T.L. Villega-Garrido. (1996). Estrategias para incrementar la excreción de metabolitos secundarios por cultivo de células vegetales. *Fronteras en biotecnología y bioingeniería*. Sociedad Mexicana de B y B, A. C. 209-207.
36. Kadioglu A. And Durmus. (1997) Effect of benzyladenine on peroxidase activity during senescence of squash (*Cucurbita pepo* L.) cotyledons. *Plant Peroxidase Newsletter*. No.10: 51-57

37. Kessell R.H J and Carr A.H. (1972) The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissue. *Journal of Experimental botany*. 23 (77): 996-1007.
38. Kuan I.C; K.A. Johnson and M. Tien. (1993). Kinetic analysis of manganese peroxidase. The reaction with manganese complexes. *Journal of Biology and Chemistry*. 268:20064-20070.
39. Klibanov , A. M Tu T.M. and Scott K. P. (1983) Peroxidase-catalysed removal of phenols from coal-conversion waste. *Water Science*. 221:259-260.
40. Kuo C.F.; I. Frodousch. (1988). Stimulation of the activity of horseradish peroxidase by nitrogenous compounds. *Journal of Biology and Chemistry*. 263: 3811-3817.
41. Lagrimini, L. M., S. Bradford. And S. Rothstein. (1990). Peroxidase-induced wilting in transgenic tobacco plants. *The Plant Cell*. 2: 7-18
42. Lechuga, A. Garcia S., Cruz S. (1994) Cultivo de tejidos vegetales. UAM
43. Liu C.Z. Wang Y.C.; Zhao B.; Guo C.; Ouyang F.; Ye H.C.; and Li G.F. (1999) Development of a nutrient mist bioreactor for growth of hairy roots. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 35 271-274
44. Lobarzewski J And Ginalska G. (1995) Industrial use of soluble or immobilized plant-peroxidases. *Plant Peroxidase Newsletter No 6 Sept.*: 3-7
45. Lozoya Saldana. (1985) Micro propagación de especies herbáceas. El cultivo de tejidos vegetales en México. 65-79.
46. Loyola, M. y R. López (1985). El cultivo de tejidos vegetales para la producción de sustancias naturales. El cultivo de tejidos vegetales en México. 125 –132.
47. Marinescu G., Badea E., Babeanu C., and Glodeanu E. (1999) Peroxidase system activity in leaves of cucumber plants as marker of growth stimulant treatment. Paper presented at the International Symposium for Plant Peroxidases – Peroxidase '99 -, Columbus, Ohio, USA (July 17-21, 1999). Organizer: Prof. L.M. Lagrimini.
48. Massey, I. J. Aitken, M. D Ball, L. M. Heck, P. E. (1994) Mutagenicity screening of reaction products from the enzyme-catalyzed oxidation of phenolic pollutants. *Environmental toxicology and chemistry*. 13 (11): 1743-1752.
49. Moreno O. A., Vazquez-Duhalt R., and Ochoa J.L. (1989) Peroxidase activity in cell suspensions and cell suspension cultures of radish *Raphanus sativus* var. Cherry Bell. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 18: 321-327.
50. Muralikrishna, C. Renganathan, V. (1993). Peroxidase catalyzed disulfonation of 3,5-dimethyl-4-hydroxy and 3,5-dimethyl-4-aminobenzene-sulfonic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 197 (2): 798-804.
51. Murashige T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiology*. 25:135-166.
52. Murashige T. and Skoog F.A. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-497.
53. Nakane, P.K. (1974) *J. Histochem. Cytochem* 22:1084-1091
54. Naturhistoriska riksmuseet, (1997). <http://linnaeus.nrm.se/flora/di/brassical/aemor/welcome.html>
55. Omann, F. Tyson, H. (1994). cDNA sequence and tissue-specific expression of an anionic flax peroxidases. *Genome* 37 (1):137-147.

56. Ortiz Montiel G. and H. Lozoya Saldaña (1987) In vitro tuberización of potato (*Solanum* sp. L.) validation in Mexico. *American Potato Journal*. 64: 535-544.
57. Pagara V.; Kino-Oka Taya and Tone. (1993) Reversible Morphology Change of Horseradish hairy roots Cultivated in Phytohormone-Containing media. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 75 (4): 271-275.
58. Parkinson M. Cotter T. (1990). Peroxidase Production by cell suspension and hairy root cultures of horseradish (*Armoracia rusticana*). *Plant Science*. 66:271-277.
59. Payne G., V. Bringi, C.Prince, M. Shuler. (1992). *Plant cell and tissue culture in liquid system*. Hanser publishers. Printed in Germany.
60. Prado B.; Huerta O.; Rodríguez S. Saucedo C. (1999) Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología. UAM pp 367.
61. Pressey, R. (1990). Anions activate the oxidation of IAA by peroxidases from tomato and other sources. *Plant Physiology*. 93(2): 798-804.
62. Quintero R., (1993). Ingeniería bioquímica. Teoría y aplicaciones. Editorial Alhambra Mexicana. Pp 332.
63. Rao S. Koduri and Ming Tien. (1995). "Oxidation of Guayacol by lignin Peroxidase" *Journal of Biology and Chemistry*. 270: 22254-22258.
64. Rasmussen, B.C.,Henriksen A. et all. (1997). Purification, characterization and stability of barley grain . *Physiologia Plantarum*. 100:102-110.
65. Repunte, V. P., Kino-Oka, M., Taya, M, and S. Tone. (1993). Reversible morphology chang of Horseradish hairy roots cultivated in phytohormone-containing media. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. Vol. 75, 4:271 -175
66. Saglio P.H., Raymond P., and Pradet A. (1983) Oxigen transport and root respiration of Maize sedling. *Plant Physiology*. 72: 1035-1039
67. Saglio P. H., Rancillac M., Bruzan F., and Pradet A. (1984) Critical oxygen pressure for growth and respiration of excised and intact roots. *Plant Physiology*. 76: 151-154.
68. Saitou T , Kamada H., Harada H , (1991). Isoperoxidase in hairy rotos and regenerated plants of (*Armoracia laphathifolia*) *Plant Science*. 75:195-201.
69. Scragg, A.(1996). Biotecnología para ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. De. Limusa. México. Pp. 410.
70. Schwyzer J. (1946) La fabricación de los alcaloides. Fondo de cultura económica. México. Pp. 161.
71. Shahangian S., and L.P. Hager. (1982). Isolation and caracterizacion of horseradish peroxidasa compound x. *Jurnal of Biology and Chemistry*. 257:11529-11533
72. Stöckigt, J.Obitz P. Falkenhagen H. Lutterbach R. and Endre B. (1995) Natural products and enzymes from plant cell cultures. *Plant Cell tissue and Organ Culture*. 43: 97-109.
73. Suensson, B. E. (1988). Abilities of peroxidases to catalyze peroxidase-oxidase oxidation of thiols. *Biochemical Journal*. 256(3):757-762.
74. Takahashi H. and Scott T. (1991) hydrotropism and its interaction with gravitropism in Maize roots. *Plant Physiology* 96: 558-564.
75. Tamaro, D (1977). Horticultura Americana. Gustavo Gil. España. Pp.510.
76. Taya M., Yoyama A.,Nomura R., Kondo O., Matsuic C.,Kobayashi T., (1989b). Production of preoxidase with horseradish hairy root cell in a two sep culture system. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 67:31-34.

- 77 Taylor C. B. (1998) Factories of the future? Metabolic engineering in plant cells. *Plant cell*, 10, 641b-644
- 78 Tyson, H. (1992) Relationships among amino acid sequences of animal, microbial and plant peroxidases. *Theoretical and Applied Genetics*, 84 (5-6): 643-655.
- 79 Uozumi N., Asano Y., Kobayashi T. (1994). Micropropagación of horseradish hairy root by means of adventitious shoot primordial. *Plan Cell Tissue Organ Cult.* 36:186-190.
- 80 Verslues, Pber and Sharp (1998) Root growth and oxygen availability in polyethylene glycol solution. *Plant Physiology* 116:1403-1412
- 81 Webb and Villalobos. (1987). *In vitro* regeneration of central and south americans conifers. *Cell and tissue Culture in Forestry*. Vol 3 Edited by Bonga and Durzan. University of California
- 82 William G. Spollen, Lenoble, Samuels, Bernstein and Sharp (2000) Ascisic acid accumulation maintain maiz primary roots elongation at low water potenciales by restricting ethylene production. *Plant Phisiology*. 122:967-976
83. WWW. Clia.org.mx / Brewer and Kendall. (1999). Consejo latinoamericano de información alimentaria
- 84 WWW Horseradish. Org. 2001
85. WWW hort.purdue.edu/newcrop/crops/horse-radish, 1999.
- 86 WWW joy.inra.fr/HYPZ/CULTURE\_16c\_016.htm. 1999.
- 87 WWW j.r. kelly company 1999
- 88 WWW.mobot.org/MOBOT/TROPICOS/China/chinal/N04100347.html. 1999.
- 89 WWW shamel.de/GESUND HTM (Compañía alemana productora de horseradish)1999.
90. WWW terryshorseradish.com.1999.
91. WWW. Silverspringgardens.com 2001
92. Yamada Y., Kobayashi S., Watanabe K., Hayashi U. (1987) Production of horse radish preoxidase by plant cell culture. *Journal Chemistry and Technol Biotechnology*. 38:31-39.