



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"IZTACALA"

**CULTIVO *in vitro* DE CANCERINA**  
**(Hippocratea excelsa H.B.K.)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MA. ANTONIETA GOYTIA JIMENEZ



MEXICO, D. F.

1992

## DEDICATORIA

A LA MEJOR MADRE,  
JUVENTINA JIMENEZ VENTURA

A MIS HIJOS HORACIO Y RODRIGO  
POR SER ELLOS.

A MI COMPAÑERO, A RUBEN

A MIS HERMANOS: MARCO ANTONIO,  
ANA MA., MA. EUGENIA, VICTOR, CRISTINA,  
MA DE LOS ANGELES, AIDA Y GILBERTO  
PORQUE HEMOS CAMINADO JUNTO HASTA AHORA.

## INDICE

Resumen.....	3
I. Introducción.....	9
II. Antecedentes.....	11
1.Plantas medicinales.....	11
2.Cancerina.....	12
2.1.Biología.....	12
2.2.Principio activo.....	14
2.2.Distribución.....	14
2.4.Uso y explotación.....	15
3.Propagación vegetativa.....	16
4.Cultivo de tejidos vegetales.....	17
4.1.Embriogénesis somática.....	18
4.2.Organogénesis.....	20
4.3.Cultivo de meristemas y yemas axilares.....	21
4.3.1. Yemas axilares.....	21
4.4.Contaminación.....	22
4.5.Exudados.....	24
III. Objetivos.....	25
1.Generales.....	25
2.Específicos.....	25
IV. Materiales y método.....	26
1.Material botánico.....	26
1.1.Datos taxonómicos.....	26

2.Técnicas utilizadas.....	26
2.1. <i>in vitro</i> .....	26
2.1.1.Cultivo de yemas axilares.....	26
2.1.2.Cultivo de Semillas.....	27
2.1.3.Cultivo de embriones.....	27
2.2.Enraizamiento de estacas.....	27
3.Esterilización de Material botánico.....	27
3.1.Yemas axilares.....	28
3.2.Semillas.....	28
3.3.Otras sustancias químicas.....	29
4.Siembra.....	30
4.1.Etapa de Establecimiento.....	30
4.2.Etapa de multiplicación.....	32
5.Medio de cultivo.....	32
5.1.Etapa de establecimiento.....	32
5.2.Etapa de multiplicación.....	35
6.Toma de datos.....	35
7 Análisis de resultados.....	36
<b>V. Resultados.....</b>	<b>37</b>
1.Enraizamiento.....	37
2.Establecimiento de cultivos asépticos.....	37
3.Exudados.....	39
4.Obtención de plantas sanas.....	40
5.Multiplicación de propagulos.....	40
5.1.Crecimiento.....	40
5.2.Longitud del inóculo.....	40
5.3.Número de brotes.....	41

5.4. Longitud de brotes.....	42
5.5. Crecimiento por semana.....	43
6. Diferencia entre concentraciones.....	44
VI. Discusion.....	46
VII. Conclusiones.....	50
VIII. Recomendaciones.....	53
IX. Bibliografía.....	54
X. Apéndice.....	57

## RESUMEN.

### INTRODUCCION.

Hippocratea excelsa, especie mexicana conocida comunmente como la cancerina, recurso mexicano no cultivado, es utilizada en la medicina tradicional para transtornos del aparato reproductor femenino, cicatrización de úlceras internas y heridas, entre otras, (Martinez 1983). Y que también a demostrado ser un excelente insecticida orgánico al ser aplicado en aspersiones acuosas, (Rodriguez 1990).

Las propiedades medicinales que presenta y la parte utilizada (corteza de la raíz), han hecho que la especie se vea seriamente amenazada al ser depredada irracionalmente y de no dar un alternativa, este elemento será facilmente extinguido, pues existen zonas en donde a lo sumo se encuentra 1 ó 2 ejemplares, Ante esto en este trabajo nos planteamos la recuperación del recurso a través de la micropropagación.

### MATERIALES Y METODO.

#### MATERIAL VEGETAL.

Se colectaron frutos y ramas jóvenes de cancerina en el municipio de Iguala Guerrero.

#### TECNICAS UTILIZADAS.

1.-Cultivo de Yemas axilares. Se obtuvieron de las ramas juvenes, seccionando la lámina y dejando trozos de

tallos de aproximadamente 5 mm junto con los peciolo para proteger las yemas.

2.- Cultivo de semillas y embriones. Se separaron las semillas del fruto sembrando unas con ala y en otras se aislaron los embriones para su germinación *in vitro*.

#### DESINFESTACION DEL MATERIAL VEGETATIVO.

1. Las yemas axilares se trataron con Manzate, Agrimicín 500 y Tecto 60 (5 g/lt de cada uno de los 2 primeros y 1 g/lt. para el segundo). Durante 24, 48 y 72 horas para los 2 primeros, posteriormente se pasaron a una solución al 10% de Hipoclorito de sodio (tomado de cloro comercial al 6%).

2. Los frutos se lavaron con detergente y agua corriente, después se desinfestaron por inmersión en una solución de Hipoclorito de Calcio al 4% por 15 minutos. En la cámara de flujo laminar se separaron las semillas del fruto y se expusieron durante 10 minutos en una solución de Hipoclorito de Sodio al 10%.

#### MEDIO DE CULTIVO.

1. Las yemas axilares se sembraron en medio básico con sales de Murashige y Skoog (1962).

2. Las semillas y embriones se sembraron en medio básico de Murashige y Skoog (1962), suplementando con Sulfato de Adenina y reguladores de crecimiento (Cinetina K, Benciladeina BA, 6-( $\gamma$   $\gamma$  -dimetilamino)purina 2iP y Acido indol-3-acético AIA) en diferentes concentraciones.

#### RESULTADOS Y DISCUSION.

1. Contaminación. Se presentó contaminación en yemas axilares y testa de la semilla que fue determinado como *Alternaria sp.*, El problema fue serio puesto que fue imposible de erradicar de las yemas axilares.

2. De las yemas axilares, se obtuvieron inóculos libres de patógenos que fueron sembrados en diferentes medios con Tecto 60, de estos inóculos no hubo crecimiento ni generaron brotes.

3. Semillas y embriones. Las semillas presentaron contaminación por el hongo *Alternaria sp.* en un 100%, localizándose en la testa de la semilla. Sin embargo el 100% de embriones sembrados no presentaron contaminación.

4. Exudados. Se presentaron problemas de intoxicación y oxidación de la planta por la presencia de exudados que cuando se aerearon los tubos y se puso carbón activado al 0.1% en el medio se logró establecer cultivos en donde

dichos exudados ya no fueron problema para los inóculos.

5.El crecimiento óptimo se obtuvo a partir de cultivo de embriones en medio con las sales básicas de Murashige y Skoog (1962), con AIA Acido indol-3-ácetico al  $0.1\text{mgL}^{-1}$  y K cinetica al  $0.3\text{mgL}^{-1}$  y  $3\text{mgL}^{-1}$  respectivamente.

#### CONCLUSIONES.

El cultivo de tejidos para la multiplicación de cancerina Hippocratea excelsa H.B.K., es una buena alternativa al problema de sobreexplotación que presenta esta planta.

Es posible tener una buena multiplicación al germinar *in vitro* embriones de cancerina que pueden ser utilizados para el cultivo de yemas axilares.

Es factible el cultivo de yemas axilares utilizando  $0.3\text{mgL}^{-1}$  de AIA combinado con: 2ip en concentraciones de 10 y  $30\text{mgL}^{-1}$ , con cinetica en concentraciones de 3, 10 y  $30\text{mgL}^{-1}$  y BA con concentración de  $10\text{mgL}^{-1}$ .

El tiempo óptimo de duración de los inóculos en el medio de multiplicación es de 3 semanas, después de este tiempo no hay cambio significativo en el crecimiento del inóculo ni en la generación de brotes.

## I.- INTRODUCCION.

La cancerina (Hippocratea excelsa H.B.K.), recurso natural mexicano no cultivado, es utilizado por las comunidades rurales para curar enfermedades como úlceras internas, gastritis, diarreas<sup>1</sup>, desinfectar llagas y heridas y para curar fiebre puerperal<sup>2</sup>. En Sasamulco Guerrero, Méx. lo más común es hacer que el ganado mediante infusión de hojas de cancerina, saque las secundinas (placenta). Por otro lado se ha demostrado que es un insecticida orgánico potente en laboratorio y campo dando hasta 100% de mortalidad en larvas de conchuela del frijol Epilachna varivestis (Mota . 1984) y 50% para el gusano cogollero del maíz Spodoptera frugiperda (Martinez 1983).

Las propiedades medicinales que presenta la planta, ha hecho que su demanda en el mercado nacional sea alta, trayendo como consecuencia que se encuentre en peligro de extinción, debido a que la parte utilizada de la planta es la corteza de la raíz principalmente y que para ser llevada al mercado, la gente extrae toda la planta como en los casos de Tonalapa del Sur, Venta y Palula en donde ya sólo se pueden localizar algunos ejemplares.

El mal uso del recurso ha traído como consecuencia

- 1.- Información verbal obtenida del mercado Sonora, el D.F y de las comunidades visitadas en el Edo. de Guerrero, Sasamulco, La Venta y Palula.
- 2.- Información verbal, obtenida de los habitantes de Sasamulco Guerrero.

que se reduzca enormemente la posibilidad de reproducción sexual de la cancerina, porque la gente que la explota no espera (puesto que no es su objetivo), la producción de semillas para propagarlas. Por lo antes expuesto se hace necesario buscar un mecanismo de propagación que garantice: 1) La obtención en poco tiempo de nuevas plantas de cancerina, 2) una tasa de propagación alta y 3) establecer en campo un cultivo de este recurso. producto de su micropropagación, que permita la propagación vegetativa de la especie a través del uso de yemas axilares, permitiendo con ello alcanzar los objetivos planteados.

## II.- ANTECEDENTES.

### 1. -LAS PLANTAS MEDICINALES.

El uso de las plantas medicinales es muy antiguo, no contamos con datos precisos, pero si con obras importantes que nos hablan del uso de ellas, así encontramos el libro *De Materia Médica* de Dioscorides en Roma y el *Código Cruz-Badiano* de Francisco de Mendoza, hijo del Primer Virrey de México o bién los 4 vólumenes de *Naturaleza y Virtudes de las Plantas Medicinales* de Francisco Hernández Jiménez (Quezada 1965).

México tiene una vasta cultura en el uso de las plantas medicinales, desde los tiempos prehispánicos hasta nuestros días. Sin embargo la búsqueda que ha hecho el hombre de plantas que le ayuden a sobrevivir y su desbocada lucha por arrancar a la naturaleza su secretos ya sea para curarse o ya para comercializarla, ha ocasionado que algunas especies vegetales esten en peligro de extinción.

Las plantas llamadas medicinales son importantes por presentar un 'Principio activo' de acción terapéutica definida que puede emplearse para modificar favorablemente los transtornos patológicos originados por las enfermedades. Estos principios activos forman parte de un grupo de sustancias químicas que los fisiólogos botánicos

denominan metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios son las sustancias en donde cada una de ellas sólo puede obtenerse de una especie vegetal particular. Por lo tanto poseen una distribución restringida ya que son productos que no se forman bajo todas las circunstancias y que no tienen una función metabólica particular. También se les conoce como 'productos naturales' y la categoría a la que pertenecen se define principalmente en término de la estructura química y se han clasificado en la actualidad como derivados de: alcaloides, terpenos, formaldehído, fenilalanina o compuestos próximos (JohnD Bu Lock, PhD 1965).

## 2.-CANCERINA

2.1 Biología.- La cancerina es una planta dicotiledonea perteneciente a la familia taxonómica Hippocrataceae, al género *Hippocratea* y especie *excelsa*. Se caracteriza por ser un bejuco de aproximadamente 4 metros de altura (algunas veces crece como arbusto). Se localiza en las margenes de los ríos o cañadas. Presenta corteza de color rojizo con tallos de aproximadamente 20 cms., de diámetro, hojas opuestas persistentes pecioladas y enteras (Fig. 1 y 2). tienen estípulas pequeñas y caducas. Flores pequeñas verdosas en panículas axilares o terminales (Standley 1926). Cáliz de 5 pétalos extendidos valvados, 3 estambres



Fig. 1. Tallo de la cancerina *Hippocratea excelsa* H.B.K.,  
colectada en La Venta, Municipio de Guerrero.

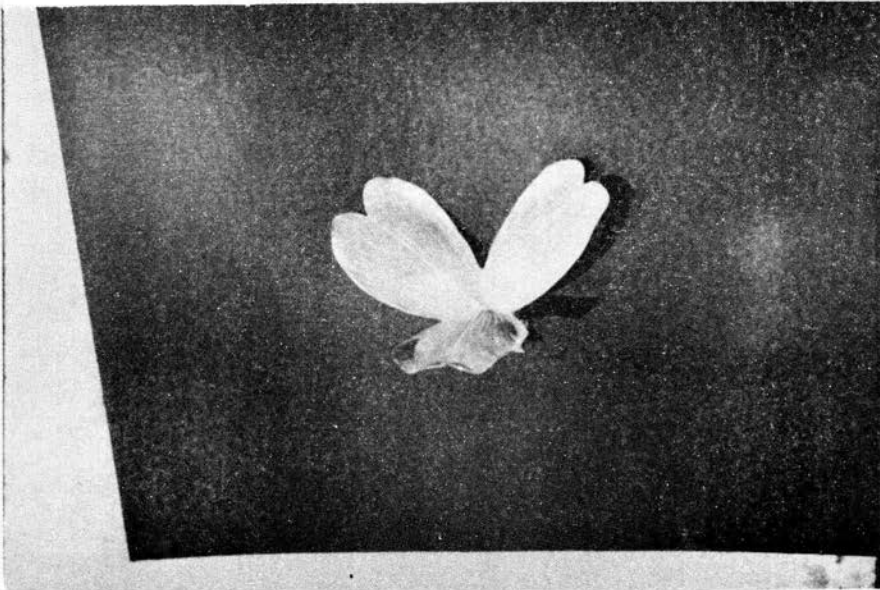


Fig. 2 Fruto alado de la Cancerina *Hippocratea excelsa*  
*H. B. K.*, colectada en La Venta, Municipio de Iguala  
Guerrero.

prominentes que sobresalen de la flor, fruto una cápsula grande fuertemente comprimido, formada por 3 carpelos bivalvos con semillas de 4-6 por lóculos. Semillas aladas y grandes. La época de floración (al menos la registrada) es en primavera<sup>3</sup>. La forma de reproducción es sexual y vegetativa<sup>4</sup> a través de rizomas, predominando esta última. En los meses de Abril-mayo encontramos a los ejemplares con numerosas inflorescencias y el suelo tapizado de pequeñas flores blancas y en los meses de septiembre-octubre, en esos mismos ejemplares sólo se pueden encontrar unos cuantos frutos (la cantidad máxima que se colectó por ejemplar, fue de 30 fruto). Por otro lado buscando en los alrededores, las únicas plantas pequeñas de cancerina son producto de rizomas profundos y no de semilla, pensamos que esto se debe en parte a la forma de dispersión de la semilla, ya que ésta es alada.

2.2.- Principio activo. Aunque no contamos con toda la información, puesto que va a ser publicada próximamente, sabemos que se ha determinado como terpenoides metilados (calzada 1989) y el esqueleto químico corresponde a las llamadas fridelinas.

3.- Información obtenida personalmente en 3 años de observaciones de campo.

4.- Información personal que se obtuvo en los recorridos de campo.

**2.3. Distribución.-** Son plantas trepadoras que se encuentran en los márgenes de los ríos o cañadas en selvas bajas caducifolias con climas cálidos subhúmedos, es decir con lluvias en verano y precipitaciones anuales sobre 1073.4 mm., sobre temperatura media anual de 26.2°C. Se reporta para los estados de Guerrero, Veracruz, Puebla Oaxaca y Tabasco (Martinez 1937). Hasta el momento la hemos colectado en la Sierra de Puebla y Guerrero. En la zona de trabajo de Guerrero se pueden reportar las siguientes poblaciones: Cerro Blanco, Zapote, La Estrella, El Naranjo, Tetelilla, Ahuehueva, Los Amates, Venta, Sabana Grande y Huitzucó<sup>5</sup>. Que son las zonas en donde se explotó o se explota en la actualidad, aclarando que en algunos de estos lugares sólo se han localizado cuando mucho 4 ejemplares o bien uno, como consecuencia de la depredación. Esta especie comparte el habitat con otro ejemplar de la misma familia (Hippocratea acapulcensis) y es fácil confundirlas, la diferencia radica en que la segunda especie presenta la corteza de color blanca y un fruto más angosto.

**2.4.- Uso y Explotación.-** El uso más común es como planta medicinal que se adquiere en los mercados de Sonora del D.F., Iguala Guerrero, Texcoco y centros naturistas del D.F., se utiliza en infusión y sirve para curar

5.-Información que se obtuvo en visitas a herbarios, campo y mercado de Iguala Guerrero.

desarreglos de mujeres, úlceras, gastritis y desinfectar heridas externas. En la zona es utilizada para curar fiebre puerperal y hacer que el ganado saque las secundinas (placenta).

Como insecticida, Rodriguez (1990) señala que se ha probado con siete especies de insectos de importancia económica, tanto en campo como en granos almacenados y que se han obtenido resultados excelentes al aplicar soluciones acuosas de cancerina en cultivos y polvo a los graneros. Nos dice el mismo autor que además de ser soluble en agua la cancerina, tolera temperaturas hasta de 90°C.

La explotación se dá por los habitantes de las comunidades, que en ocasiones son adiestrados por los compradores, no es extraño escuchar a los ejidatarios, decir que llegan señores que los enseñan a cortarla y secarla, para que después lleguen éstos con camionetas a sacar el producto. Hasta el momento el centro comercial más grande que se ha localizado es el mercado Sonora en el D.F.

### **3.- Propagación vegetativa.**

La cancerina es un recurso natural de colecta, de ahí que su propagación por los métodos tradicionales como estacado, acodo, injerto y esqueje, no han sido aplicados a esta

**especie o al menos no hay reporte de ello.**

En la actualidad tenemos el método de cultivo de tejidos en donde se obtiene a partir de cualquier parte de la planta un crecimiento inicial de callo y después de formación de plantas o bien del explante se puede obtener nuevas plantas. Esta técnica puede ser un método ideal para la propagación de la cancerina o de cualquier otra especie

#### **4. Cultivo de tejidos vegetales.**

Desde hace tiempo, el hombre ha utilizado la técnica de cultivo de tejidos con diferentes intenciones: aportar nuevos conocimientos a la Fisiología Vegetal, explicar el papel que juegan en las plantas elementos como las vitaminas y las hormonas de crecimiento entre otros (Thorpe 1978, Hurtado 1987). Esta técnica de cultivo de tejidos consiste en cultivar en el medio nutritivo, definido y en forma aséptica, células, tejidos y otras partes de la planta en condiciones de incubación. La técnica parte del principio de que toda célula viva posee un núcleo que es capaz de reproducir las características de la planta de la cual proviene (principio de totipotencial celular), principio que nos dice que las células pueden expresarse fácilmente, fenómeno que nos permite orientar nuestros cultivos a la formación de cualquier órgano y también para que las células puedan

remontar las etapas de su historia y vuelvan a convertirse en embriones (Thorpe 1978). Este estado que se caracteriza por tener 2 polos en extremos opuestos, uno dará origen al tallo y el otro a la raíz. Así mismo el cultivo de tejidos vegetales puede servir para la extracción de productos naturales que pueden ser utilizados como fuente de farmacos. Otro aspecto importante es la contribución al estudio de la embriogénesis, organogénesis y cultivo de yemas axilares.

Por las características de la técnica antes señalada y dado el alto potencial regenerativo celular, el cultivo de tejidos ha logrado ofrecer una utilización importante a la propagación clonal de numerosas especies vegetales. Así la propagación vía cultivo de tejidos, puede lograrse a través de los métodos siguientes:

#### **4.1. Embriogénesis somática.**

Es la formación de un embrión no cigótico, que se obtiene de células esporofíticas.

El número de plantas que se pueden regenerar a través de la embriogénesis somática es alto, Thorpe (1978) indica que este proceso se ha desarrollado en 80 especies de 33 familias, incluyendo desde leguminosas hasta coníferas.

Las ventajas que presenta este tipo de técnica son:

1) Producción de un alto número de embriones, 2) los embriones así formados presentan raíces y meristemas cortos en la misma unidad y 3) el embrión puede tener crecimiento individual entre otras. (Liss 1987).

En el desarrollo de la embriogénesis somática se dan eventos que los podemos separar en las categorías siguientes: inducción, crecimiento, maduración y la germinación.

Para la inducción (Liss 1987) señala que pueden existir 2 caminos, uno marcado por células determinadas para el desarrollo embriogénico presentes en el explante, para este caso (Thorpe 1978) nos habla de células que provienen de la nucela inmadura o de embriones cigóticos maduros. Y en el segundo se tiene que inducir en células maduras completamente diferenciadas y se logra al adicionar auxinas al medio de cultivo en donde ponemos el explante. Se forman proembriones en los dos casos.

El crecimiento se da cuando se separan los proembriones generados y se ponen en un medio con auxinas libres que pueden ser Acido 2,4--diclorofenoxiacético y Acido naftalenacético (Liss 1987).

En el proceso de maduración pueden existir problemas como los siguientes: a) división celular excesiva, b)

vacuolación precoz, c) continuación de división celular en el alargamiento celular, d) alteración de la orientación en el uso cromático, e) diferenciación precoz y f) retardo en la iniciación de cotiledones y ápices cortos, entre otros. (Liss 1987).

Sin embargo estos crecimientos anormales pueden ser manipulados y modificados, transformando el medio de cultivo pudiendo ser los nutrientes sobre todo el nitrógeno, (Armstrong y Green 1985, citado por Lis 1987), las hormonas exógenas, el medio ambiente (luz) o incrementando la presión osmótica etc.

#### 4.2. ORGANOGENESIS

Muchas especies son fáciles de regenerar a partir de partes diferenciadas de las plantas que pueden ser inducidas a estados de niveles ontogénicos. La regeneración se puede dar a partir de fragmentos de tallos, fragmentos de raíces, fragmentos de hojas, de flor o médula. En muchos casos estos fragmentos forman callos seguidos por diferenciación de traqueidas asociados frecuentemente con la formación de retoños o raíces.

La formación de órganos como producto de la regeneración depende del balance de auxinas/citocininas adheridas al medio de cultivo. En muy pocos casos hay formación de flores.

La morfogénesis se puede dar para un gran número de especies y se extiende para especies leñosas que se han considerado difíciles para injertar.

Mediante estudios fisiológicos y morfogénicos se ha descubierto que la regeneración de las plantas está genéticamente determinada, además de que el citoplasma fuera de lo genéticamente determinado, puede reaccionar a sustancias de crecimiento.

Ahora bien, se han estudiado especies con capacidad de regeneración a partir de brotes y se ha encontrado que lo hace a partir de células epidérmicas del tallo, de hojas o en otros casos del parénquima.

**4.3. Cultivo de meristemas y yemas axilares.** Consiste en sembrar en medio de cultivo meristemas sobre todos los apicales, que han sido los más efectivos (Quak, 1977 citado por Hurtado y Merino 1988) para la producción de plantas completas en forma rápida y al combinar esta técnica con la termo y/o quimioterapia, se logran plantas libres de patógenos.

2) **4.3.1 Yemas axilares.** Dentro del cultivo de meristemas podemos hablar del cultivo de yemas axilares que para plantas leñosas por su eficiencia tienen una gran importancia en la multiplicación de éstas. Muraschige

(1980) para la jojoba (Simmondsia chinensis ) habla de una rápida multiplicación de yemas axilares de la misma, o bien Takeuchi (1973) plantea que las yemas axilares son un poco más fructíferas que los meristemos apicales. Por otra parte Nkanka (1981) obtuvo sus mejores resultados al trabajar con Eucalyptus Rudis sembrando yemas axilares protegidas por pecíolos y fragmentos de lámina de la hoja. Así mismo Hartny (1981) señala para varias especies de Eucaliptus obtuvo resultados positivos al utilizar yemas axilares unidas al pecíolo. En este sentido Bonga (1974) es más claro cuando plantea las ventajas que se tienen al trabajar con las yemas axilares de las plantas leñosas: 1) las yemas de los árboles son promotoras importantes de raíces, 2) las yemas son fáciles de esterilizar superficialmente por estar bien protegidas con escamas y 3) trabajando con yemas es fácil obtener brotes sin tener que inducirlos mediante cultivo.

4.4. Contaminación. Al utilizar la técnica de cultivo de tejidos es fácil encontrar la contaminación del material vegetal utilizado por un rango amplio de microorganismos que afectan seriamente el crecimiento de las células. Para Knauss(1970) uno de los problemas de mayor consecuencia en el cultivo de tejidos vegetales es la contaminación bacteriana, mientras que para Shields (1984) son los hongos patógenos importantes y recomienda el empleo de Benlate en bajas concentraciones:  $5gL^{-1}$ .

Para este problema se plantea como necesaria una etapa de desinfestación de los inóculos. Abordada en forma diferente por los distintos autores, así Knauss (1979) habla de un preacondicionamiento del inóculo en ambiente frío y seco como útil para resolver el problema y rechaza la utilización de gentamicina como parte del tratamiento. Por su lado Montant (1957) habla de la posibilidad del antibiótico para prever la proliferación de bacterias, aunque advierte que puede impedir seriamente el crecimiento del tejido. Recomendando por lo tanto que cuando se utilice, se haga sólo en cultivo de bajas temperaturas.

3 - Street (1977) nos presentará un cuadro de utilización de agentes desinfectantes y tiempos para tratar a las diferentes partes de las plantas a cultivar. Así propone para semillas la utilización de hipoclorito de calcio al 4 % por 5 minutos o solución de agua bromurada al 1%, para tallos recomienda 15-30 min. de hipoclorito de sodio al 2%, aunque De la Rosa (1988) utiliza 30 minutos de hipoclorito de sodio al 10% después de tratar yemas axilares de canela con Agrimicín 500 y Manzate durante 24 horas. Eliminando la contaminación de los inóculos por agentes sistémicos.

4.5 Exudados. Para William M. Roca y Dr. Navarro del CIAT. Cali, Colombia y CICY Yucatán, respectivamente, en

comunicación verbal plantean que el elemento tóxico producto del metabolismo del inóculo que se libera al tubo de ensaye es el etileno y que puede ser controlado para el primero inhibiendo la síntesis del mismo aplicando el medio de cultivo  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de nitrato de plata y para Navarro el etileno se puede eliminar a través del intercambio gaseoso, ya sea aereando los tubos o bien perforando los tapones de los tubos de ensaye y poniendo en el orificio un algodón estéril que permita el intercambio gaseoso.

### III.-OBJETIVOS.

#### 1. Generales:

- Establecer las condiciones in vitro que permitan la obtención y multiplicación de propágulos de cancerina a partir de yemas axilares.

#### 2. Especificos:

- Establecer el cultivo aséptico in vitro de yemas axilares.
- Determinar que factores del medio de cultivo favorecen la brotación y multiplicación de yemas axilares de los propágulos de cancerina.
- Establecer de manera paralela el cultivo de cancerina por el método tradicional del estacado.

#### IV.- MATERIALES Y METODO.

1. **Material botánico.** Se colectó material botánico en estado silvestre en la zona de la Venta ejido del municipio de Iguala Guerrero. consistiendo en hojas, yemas axilares y fruto. Estos últimos sólo fue posible colectarlos de Agosto a noviembre de 1989 y 1990. El material colectado excepto los frutos fueron puestos en antioxidante (ácido cítrico  $150 \text{ mgL}^{-1}$  y ácido ascórbico  $100 \text{ mgL}^{-1}$ ) desde el campo hasta su uso en el laboratorio.

1.1 **Datos taxonómicos.** Se identificó y determinó el nombre científico de la especie constatando con material herborizado en el Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológica del IPN, Herbario Nacional de México, Herbario Hortario del Colegio de Postgraduados y Herbario de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo, .

El material herborizado fue entregado al herbario de la Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

## 2..Técnicas utilizadas

### 2.1. IN VITRO

2.1.1. Cultivo de Yemas axilares.-Se obtuvieron de ramas jóvenes seccionando la lámina, dejando trozos de tallos de aproximadamente 5 milímetros, junto con pecíolo para proteger yemas. La separación se hizo con bisturí estéril, en caja petri estéril que contenía solución antioxidante (ácido cítrico  $150 \text{ mgL}^{-1}$  y ácido ascórbico  $100 \text{ mgL}^{-1}$ ).

2.1.2. Cultivo de semillas con su cubierta alada, que se obtuvieron al romper el pericarpio del fruto.

2.1.3 Cultivo de embriones, se obtuvieron al remover la cubierta alada.

### 2.2. Enraizamiento de estacas.

2.2. De las ramas colectadas se sacaron 80 estacas que fueron puestas en invernaderos con dos enraizadores diferentes: radix 20 y ácido indobutílico a 2,500 partes por millón. Se hicieron dos bloques de 40 estacas c/u para los tratamientos arriba mencionados. Se sumergió uno de los extremos de la estaca en los recipientes que contenían a los enraizadores y se plantaron éstas después en camas de invernadero en donde se

les proporcionó humedad y temperatura, esta última a 28<sup>o</sup>C.

3) **3. Esterilización del material botánico.** El material vegetal utilizado en los diferentes experimentos, se lavó con detergente y Tween 20 (este último para romper la tensión superficial ), se enjuagaron con agua corriente.

Posteriormente se pasaron a soluciones de hipoclorito de sodio al 10% ( a partir de cloro comercial al 6%) y en hipoclorito de calcio al 4%, ( cuadro 1 y 2) difiriendo en el tiempo de permanencia dentro de la solución, dependiendo de la parte de la planta utilizada, como se describe a continuación:

**3.1. Yemas axilares.** Estuvieron inmersas en la solución durante 15, 30 y 45 min.

**3.2. Semillas.** Aquí el tiempo de inmersión fue de 5, 10 Y 15 minutos (Cuadro 1).

CUADRO 1: TRATAMIENTO DE DESINFESTACION PARA SEMILLAS DE  
Hippocratea excelsa H. B. K.

	Hipoclorito de sodio (6% comercial)	Hipoclorito de calcio	Tiempo
T-1	10%	_____	5 minutos
T-2	10%	_____	10 minutos
T-3	10%	_____	15 minutos
T-4	_____	4%	5 minutos
T-5	_____	4%	10 minutos
T-6	_____	4%	15 minutos

3.3. Otras sustancias químicas. Las yemas axilares después de haber pasado a la solución de hipoclorito de sodio al 10%, se pusieron en vasos de precipitado que contenía un bactericida (Agrimicín 500) y fungicidas (Manzate y Tecto 60) con los tiempos y combinaciones señalados en el cuadro 2 y en las concentraciones  $5\text{g mL}^{-1}$  para los 2 primeros y  $1\text{g mL}^{-1}$  para el tercero. Este diseño se hizo atendiendo a la recomendación de De la Rosa (1988). Por último se enjuagaron 3 veces con agua destilada esterilizada dentro de la cámara de flujo laminar.

El Tecto 60 que es un fungicida sistémico, fue puesto también en el medio básico de Murashige y Skoog (1962) en la concentración de  $1\text{g mL}^{-1}$ .

**CUADRO 2 : TRATAMIENTO DE DESINFESTACION PARA YEMAS DE *Hippocratea***

	Hipoclorito sodio	Hipoclorito de calcio	Manzate	Agrimicin 500	Tecto 60	Tecto 60 <sup>1</sup>
T-1	30 min. al 10%	-----	-----	-----	-----	-----
T-2	30 min. al 10%	-----	5gmL <sup>-1</sup> 24 hrs.	5gmL <sup>-1</sup> 24 hrs.	-----	-----
T-3	-----	4% 30 min.	-----	5 gmL <sup>-1</sup> 30 min.	1 gmL <sup>-1</sup> 30 min.	1 gmL <sup>-1</sup>
T-4	-----	4% 30 min.	-----	5 gmL <sup>-1</sup> 30 min.	1 gmL <sup>-1</sup> 30 min.	
T-5	-----	4% 30 min.	-----	-----	-----	1 gmL <sup>-1</sup>
T-6	-----	4% 30 min.	-----	-----	-----	-----
T-7	10% 30 min.	-----	5 gmL <sup>-1</sup> 1 hora	5 gmL <sup>-1</sup> 1 hora	-----	.1gmL <sup>-1</sup> .3gmL <sup>-1</sup>
T-8	10% 30 min.	-----	5 gmL <sup>-1</sup> 1 hora	5 gmL <sup>-1</sup> 1 hora	-----	1 gmL <sup>-1</sup>
T-9	10% 30 min.	-----	5 gmL <sup>-1</sup> 1 hora	5 gmL <sup>-1</sup> 1 hora	-----	-----

1. Marcas registradas.

#### 4. Siembra.

##### 4.1. Etapa de establecimiento

Las semillas (208) se establecieron en el medio básico de Murashige y Skoog (1962), (cuadro 3) el cultivo se hizo en la cámara de flujo laminar.

4) **CUADRO 3: SALES INORGANICAS DE Murashige y Skoog (1962)**

	mgL <sup>-1</sup>
<b>Nitratos</b>	
Nitrato de amonio (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1 650
Nitrato de potasio (KNO <sub>3</sub> )	1 900
<b>Sulfatos</b>	
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	370
Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O)	22.3
Sulfato de zinc (ZnSO <sub>4</sub> O)	8.6
Sulfato cúprico (CuSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O)	0.025
<b>Hálogenos</b>	
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	440
Yoduro de potasio (KI)	0.83
Cloruro de cobalto (CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	0.025
<b>PO<sub>4</sub>, BO<sub>3</sub>, MO<sub>4</sub></b>	
Fosfato de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	170
Acido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	6.2
Molibdato de sodio (Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> .2K <sub>2</sub> O)	0.25
<b>Na, Fe, EDTA</b>	
Acido etilendiaminotetracético (sal disódica) (Na <sub>2</sub> EDTA)	37.31

Embriones: cabe mencionar que la semilla carece de endospermo y que solamente removiendo la testa se obtuvieron 90 embriones que fueron puesto en medio básico antes descrito.

Yemas axilares. Se sembraron con trozos de tallos de aproximadamente 5 cm. a las cuales se les removió la mitad

A) de la lámina utilizado el medio descrito en el cuadro 3 más  $1 \text{ gmL}^{-1}$  de Tecto 60. Para el testigo se utilizó dicho medio sin Tecto 60, se trabajó en condiciones estériles dentro de la campana de flujo laminar.

#### 4.2 Etapa de multiplicación

En la fase de multiplicación se sembró el material vegetal proveniente de la etapa de establecimiento, que consistió de: 1).- material producto de la germinación de embriones (plántulas) y 2).- de trozos de estas plántulas con dos yemas axilares y 3).- brotes que se presentaron en algunas de estas plántulas. Esta siembra se realizó en la cámara de flujo laminar con material estéril. Para un segundo momento, ya seleccionado el medio de cultivo según la respuesta del material vegetal y el tipo de regulador involucrado, se cultivaron yemas que como ya se dijo se obtuvieron a partir de los inóculos producto de la germinación de embriones (Fig.3 y 4 ).

#### 5. Medio de cultivo.

A) 5.1. Etapa de establecimiento: Tanto para yemas como para semillas y embriones, se utilizaron las sales básicas de Murashige y Skoog ( MS) ( 1962) al 100%, complementadas con  $100 \text{ mgL}^{-1}$  de m-inositol,  $30 \text{ gmL}^{-1}$  de sacarosa,  $0.4 \text{ mgL}^{-1}$  de Tiamina y 8 gm de agar por litro (Cuadro 3).

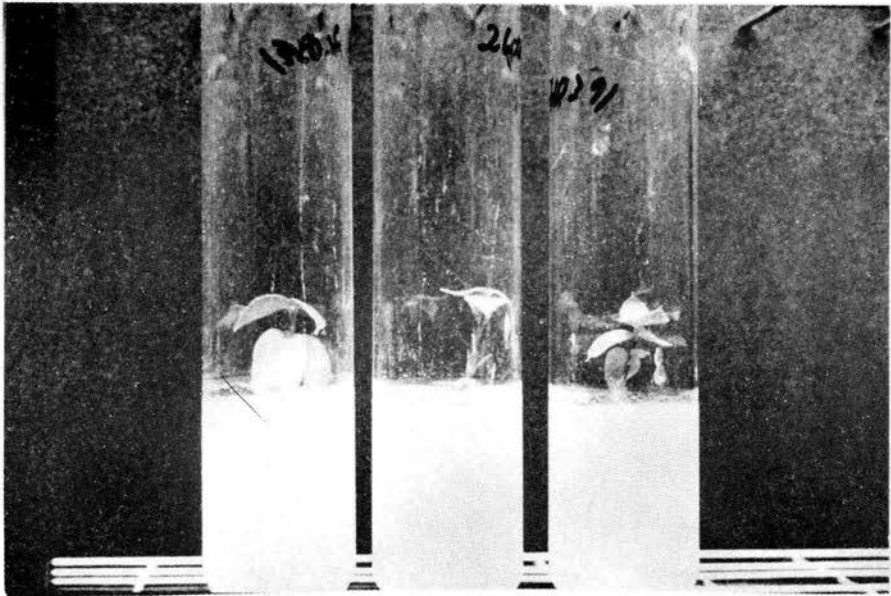


Fig.3 Cultivo *in vitro* de cancerina *Hippocratea excelsa* H. B. K., en medio básico de Murashige y Skoog suplementado.

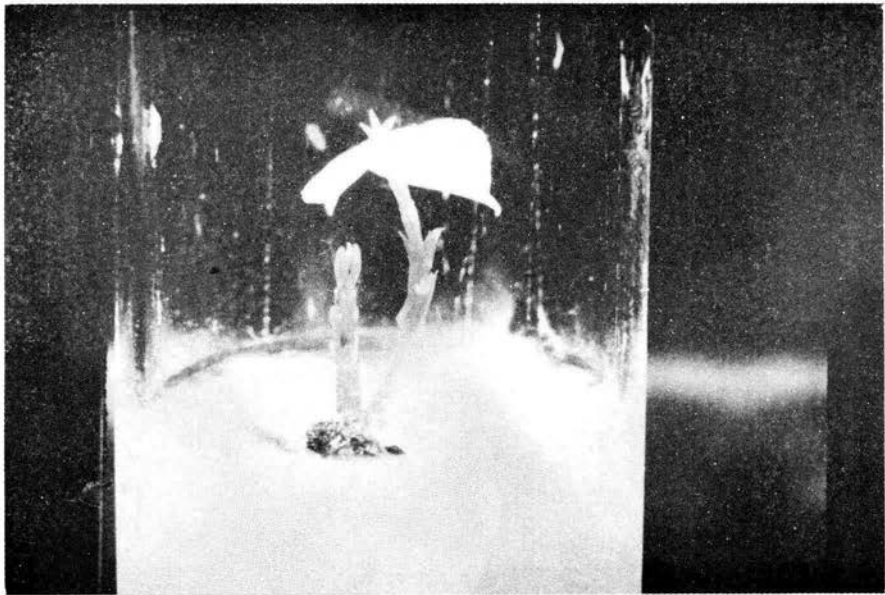


Fig.4 Brote de cancerina en el medio básico de Murashige y Skoog suplementado con AIA y Cinetina.

4)

5.2 Etapa de multiplicación. Se utilizaron las sales básicas de Murashig y Skoog (MS) al 100%, 100 mgL<sup>-1</sup> de m-inositol, 30 gmL<sup>-1</sup> de sacarosa, 0.4mgL<sup>-1</sup> de tiamina, 0.5mgL<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0.5mgL<sup>-1</sup> de piridoxina HCL, Sulfato de Adenina 80 mgL<sup>-1</sup> y 8 gm de agar-agar por litro. Se establecieron 3 diseños con diferentes reguladores de crecimiento en donde el AIA (ácido indol-3-acético) se mantuvo constante y K (cinetina), BA (Benciladenina), 2iP 6(γ γ dimetilalilamino)purina) variaron en una escala semilogarítmica de concentraciones (Cuadro 4,5 y 6)

**CUADRO 4: TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA LA ETAPA DE MULTIPLICACION**

Tratamiento	auxinas mgL <sup>-1</sup>	citocininas mgL <sup>-1</sup>
Testigo	AIA 0.1	2iP 0
Tratamiento 1	AIA 0.1	2iP 3
Tratamiento 2	AIA 0.1	2iP 10
Tratamiento 3	AIA 0.1	2iP 30
Tratamiento 4	AIA 0.1	2iP 100

4)

**CUADRO 5:** TRATAMIENTO UTILIZADO PARA LA ETAPA DE MULTIPLICACION

Tratamiento	Auxinas mgL <sup>-1</sup>	Citocininas mgL <sup>-1</sup>
Testigo	AIA 0.1	BA 0
1	AIA 0.1	BA 3
2	AIA 0.1	BA 10
3	AIA 0.1	BA 30

**CUADRO 6:** TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA LA ETAPA DE MULTIPLICACION

Tratamiento	Auxinas mgL <sup>-1</sup>	Citocininas mgL <sup>-1</sup>
Testigo	AIA 0.1	K .0
1	AIA 0.1	K 3
2	AIA 0.1	K 1
3	AIA 0.1	K 3

**6. Toma de datos:** Se evaluaron las variables siguientes:

1) longitud del inóculo que se obtuvo midiendo cada semana el crecimiento del inóculo tomado de donde el explante sale del agar hasta la punta del ápice. Cuando se sembraron brotes o plántulas, se tomó la medida que presentaban a la siembra y se saco la diferencia entre estas medidas y las de las lecturas posteriores. Las medidas se tomaron con regla y fue en milímetros, 2) longitud del brote, se tomó de la yema axilar hasta el ápice, fue tomada en mm. con regla cada semana. Los brotes se enumeraron en forma ascendente según el orden de aparición., 3) Se tomó el número de brotes por inóculo que fueron apareciendo en cada semana., 4) Se tomó el número de hojas por inóculo y por brotes, así como el color y tamaño de las mismas.

**7. Análisis de resultados:**

Los datos fueron trabajados con el programa SAS y se obtuvo la media, desviación standar varianza, análisis de varianza para cada una de las variables medidas comparando los diferentes medios de cultivo y las concentraciones, se establecieron correlaciones entre el número de brotes en función del crecimiento del inóculo.

## V. RESULTADOS.

### 1. Enraizamiento de estacas.

De las 80 estacas que se establecieron en invernadero, sólo 7 de ellas presentaron brotación después de 8 meses y ninguna enraizó.

### 2. Establecimiento de los cultivos asépticos.

De los cultivos de yemas axilares de plantas maduras no se pudo obtener material para establecerlo *in vitro*, por presentarse un hongo (Alternaria sp.) que fue difícil de combatir. Cuando se logró controlar (ver cuadro 6), este material mostró dificultad para responder a los reguladores de crecimiento puestos en los medios de cultivo como se muestra en los cuadros 6,7 y 8. Además gran parte de este material (281 de 333 inóculos que representan el 84%) murió sin que se pudiera sembrar en medio con reguladores.

Para determinar el género del hongo fue necesario hacer cultivos del mismo, en PDA (medio papa-dextrosa-agar). Para la identificación fue necesaria la observación de las colonias y de las muestras a través del microscopio, así como el uso de claves de Alexopoulos (1966).

**cuadro 6** Efecto del AIA y BA en material de cancerina tratado con tecto 60 en el medio de cultivo.

Tratamiento	Reguladores		inóculos asépticos
	AIA	BA	
1	0	0	100% sin respuesta
2	.1	0	100% sin respuesta
3	0	.1	100% sin respuesta
4	.1	.1	85% sin respuesta
5	.1	.3	100% sin respuesta
6	.1	1	100% sin respuesta
7	.1	3	100% sin respuesta
8	.1	10	100 sin respuesta

**cuadro 7.-** Efecto del AIA y Cin en el material de cancerina tratado con tecto 60 en el medio de cultivo.

Tratamiento	Reguladores		Inóculos asépticos
	AIA	K	
1	0	0	100% sin respuesta
2	.1	0	100% sin respuesta
3	0	.1	100% sin respuesta
4	.1	.1	100% sin respuesta
5	.1	.3	25% de respuesta
6	.1	1	35% de respuesta
7	.1	3	10% de respuesta
8	.1	10	100% sin respuesta

**CUADRO 8.-** Tratamientos de desinfección superficial a yemas axilares de cancerina y tecto 60 en el medio de cultivo.

Pesticidas	yemas	mueartos	patogenos Hongos bacterias	
	91	91		
Agrimicín 500, Manzate 5gL <sup>-1</sup> para cada uno	119	119		
Agrimicín 500, Tecto 60 5gL <sup>-1</sup> y 1 gL <sup>-1</sup> respec- tivamente.30 min.	75	31	38	6
Agrimicín 500, Tecto 60, 5gL <sup>-1</sup> y 1 gL <sup>-1</sup> respec- tivamente, 1 hr.	48	40	5	3
Tecto 60 en el medio de cultivo 1 ghmL <sup>-1</sup>	40	2	0	0

### 3. Exudados.

Otro problema en este trabajo fue la presencia de exudados que dañaron a los inóculos provocando su muerte, empezando por el ápice, o bien oxidándose el tejido que estaba en contacto con el medio y que impedía el

desarrollo del inóculo y a la larga la muerte del mismo, así como la pérdida de hojas del explante. Esto se controló quitando el sello de los tubos y aereando los mismos una vez por semana dentro de la cámara de flujo laminar.

**4. Obtención de plantas sanas.** Se obtuvieron al germinar embriones, puesto que cuando se sembraron semillas enteras, estas presentaron contaminación en la testa con el hongo ya mencionado y que se identificó como un patógeno sistémico.

La germinación de semilla estuvo entre un 98 y 100%

#### **5. Multiplicación de propágulos.**

**5.1 Crecimiento.** Para los diferentes reguladores utilizados en los cuadros 3, 4 y 5, se obtuvieron los siguientes resultados:

**5.2 Longitud del inóculo.** Para esta variable el análisis de varianza mostró una diferencia significativa entre el crecimiento de los inóculos en cada uno de los medios probados y con la prueba de Tukey se estableció que el mejor regulador en este reglón resultó ser el 6-( $\gamma$  y dimetilalilamino)purina (2ip) con las concentraciones de 100, 10, 30mgL<sup>-1</sup>(ver tabla y fig.1) siguiéndole la Cinetina con las concentraciones 3 y 30 mgL<sup>-1</sup>.

EFFECTO DE LA CIN., BA. Y 2iP EN LA LONGITUD DE LOS  
INOCULOS DE CANCERINA (*Hippocarea excelsa* H. B. K.)

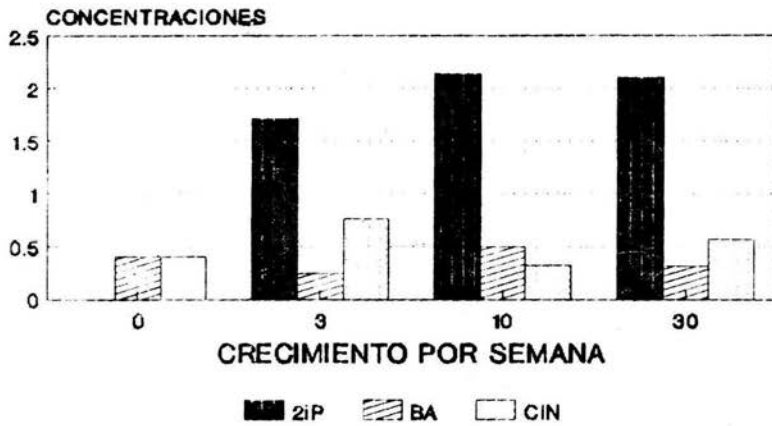


FIG. 1

**TABLA 1** Efecto del 2iP, Cin. y BA en la longitud total de los InÓculos de cancerina.

Tratamiento de crecimiento		Concentración media $\text{mgL}^{-1}$	
2iP	100	<u>3.452</u>	A
2iP	10	2.135	A B
2iP	30	2.109	A B
2iP	3	1.716	B C
Cin	3	0.760	B C
Cin	30	0.562	C
BA	10	0.504	C
BA	0	0.400	C
Cin	10	0.320	C
BA	30	0.305	C
BA	3	0.240	c

Z/ medias con la misma letra son iguales estadísticamente ( $\leq 0.05$ ), prueba de Tukey.

**5.3 Número de brotes.** Para la multiplicación de brotes se encontró que hubo diferencias significativas entre la multiplicación de los brotes según el medio de cultivo utilizado.

La prueba de Tukey indicó que el mejor tratamiento fue el que presentaba el 2iP en la concentración  $10\text{mgL}^{-1}$

EFFECTO DE LA CIN., BA. Y 2iP. EN EL NUMERO DE  
BROTOS DE CANCERINA. (*Hippocratea excelsa* H. B. K.)

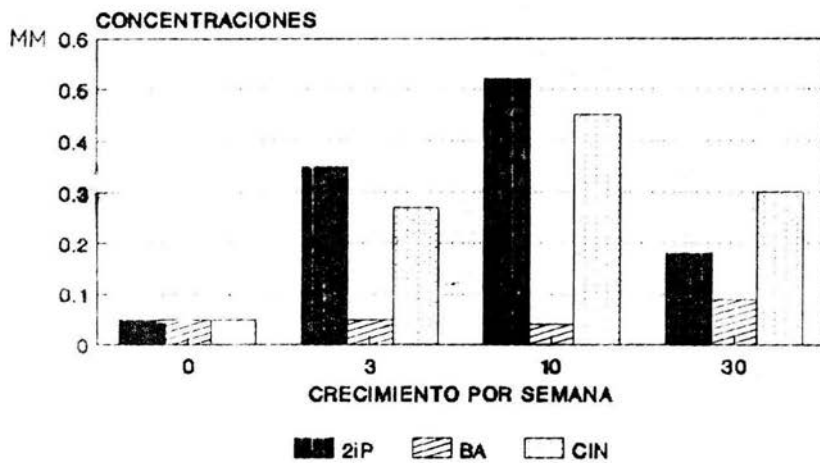


FIG 2

siguiéndole la Cinetina con la misma concentración, se muestra en la tabla 2.

**TABLA 2.-** Efecto del 2iP, Cin y BA en el número final de brotes obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de yemas axilares de *Hippocratea excelsa* H.B.K.

Tratamientos	Concentración		media	
		mgL <sup>-1</sup>		
			<u>Z/</u>	
2iP	10	0.516	A	
Cin	10	0.450	A	B
2iP	3	0.348	A	B
Cin	30	0.300	A	B C
Cin	3	0.267	A	B C
2iP	30	0.178	A	B C
BA	30	0.091		B C
BA	0	0.050		B C
BA	3	0.047		B C
BA	10	0.043		C
2iP	100	0.000		C

Z/ medias con la misma letra son iguales estadísticamente ( $\leq 0.05$ ), prueba de Tukey

**5.4. Longitud de los brotes.** Aquí también el análisis nos muestra que hubo diferencias significativa en la respuesta a los diferentes tratamientos.

La prueba de Tukey establece (según la tabla y fig. 3) que el mejor de ellos fue el que contenía el regulador

EFFECTO DE CIN., BA Y 2iP EN LA LONGITUD DE LOS  
BROTOS DE CANCERINA. (*Hippocratea excelsa* H.B.K.)

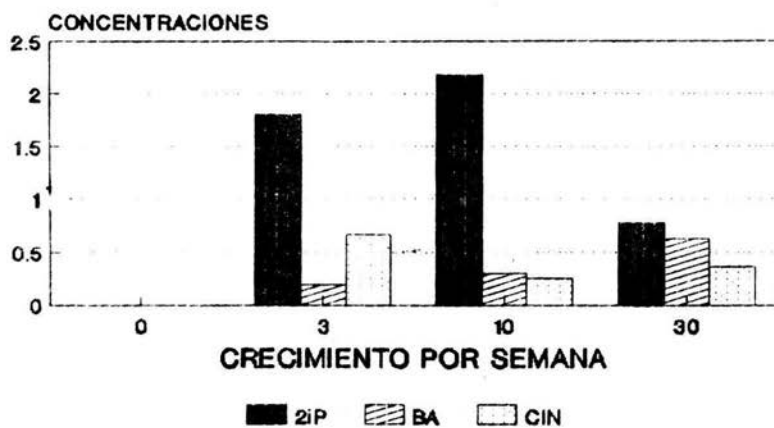


FIG 3

2iP en la concentración de 10 mgL<sup>-1</sup>.

**TABLA 3.-** Efecto del 2iP, Cin y BA en la longitud total de los brotes de "cancerina"

Tratamiento de crecimiento	Concentración mgL <sup>-1</sup>	media	
2iP	10	2.184	A
2iP	100	1.074	B
2iP	3	0.807	B C
Cin	3	0.778	B C
BA	30	0.667	B C
Cin	30	0.632	B C
BA	10	0.360	B C
Cin	10	0.298	B C
Cin	3	0.250	B C
BA	0	0.186	B C

Z/ medias con la misma letra son iguales estadísticamente (< = 0.05), prueba de Tukey.

**5.5. Crecimiento por semana.** El crecimiento para las variables evaluadas con los diferentes reguladores, no presentaron diferencias significativas (tabla 4) y estas fueron evidentes cuando se compararon los crecimientos totales.

**TABLA 4.** - Analisis de correlación entre reguladores y la respuesta de las variables medidas, representadas por sus medias totales

VARIABLE	2iP	BA	Cin.
Long I.	0.9359	0.4605	0.3500
Long B	0.3755	0.5801	0.1402
Núm. B	0.4692	0.8993	0.7571

**5.6. Diferencia entre concentraciones.** Cuando se compararon las diferentes concentraciones se estableció que entre las utilizadas, la única que presentó diferencias significativas fue la de 30 mgL<sup>-1</sup>, siendo el mejor regulador el 2iP y siguiendole en orden de importancia la Cinetina según la tabla 5, que se describe a continuación.

**TABLA 5.** -Crecimiento final de los inóculos para la concentración 30 mgL<sup>-1</sup> de 2iP, Cin y BA.

REGULADORES	MEDIA	
2iP	1.984	A
Cin	0.562	B
BA	0.311	B

## VI. DISCUSION.

Los problemas presentados en este trabajo fueron contaminación y oxidación básicamente.

Contaminación: Los microorganismos como el hongo que se presentó en las yemas axilares y testa de la semilla de cancerina, son elementos que pueden entrar en los tejidos de las plantas superiores y comportarse como agentes patógenos o bien expresarse cuando una parte de la planta es sembrada in vitro (Street 1977), y por supuesto cuando estas los contienen. Es muy común encontrarse, sobre todo en plantas leñosas, con la presencia de patógenos sistémicos, es decir que se transportan por toda la planta valiéndose de los medio de conducción de ésta. Este tipo de organismos no pueden ser eliminados con tratamientos de desinfestación del inóculo, se requiere de tratamientos con fungicidas conocidos como sistémicos que actúan al ser translocados por la planta utilizando al igual que el patógeno, el sistema de conducción de ésta (Agrios 1986). A este grupo de fungicidas pertenece el Tecto 60 que fue puesto en el medio de cultivo y que eliminó el hongo pero que también inhibió el efecto de los reguladores, impidiendo el desarrollo de los inóculos así tratados.

Al respecto Montant (1957), advierte que la utilización de productos químicos como los fungicidas,

pueden impedir seriamente el crecimiento del tejido vegetal que fue expuesto a estos, aun antes del cultivo in vitro.

(1) Lo cual explica porque los explantes que fueron puesto en medio que contenía sales básicas de Murashige y Skoog (1962) y Tecto 60 y que sobrevivieron fueron puestos en medio de cultivo que contenia reguladores de crecimiento, mostraron incapacidad para responder a estos, como se señala en los cuadros 6 y 7, y que después de un periodo, estos murieran.

Otro de los problemas presentados en este trabajo, fue la producción de exudados que intoxicó a un buen número de inóculos provocando su muerte, sin embargo, cuando los inóculos que empezaban a mostrar daños, fueron cambiados a un medio fresco en tubos sin sellar y se arearon en la cámara de flujo laminar, estos respondieron recuperándose y generando brotes laterales producto desde nuestro punto de vista de la muerte del ápice.

Por lo anterior y por la pérdida de hojas en el material aun en los brotes nuevos y amarillamiento de las mismas, nos hace pensar que son síntomas consecuentes de la presencia de etileno producido por los inóculos y que este, al ser liberado al tubo de ensaye actua sobre los inóculos. Y que se aculaba menos al no estar sellados los

tubos o al intercambiarse por oxígeno cuando se areaban los tubos en la cámara de flujo laminar. (Jackson 1990)

La obtención de plantas sanas fue a partir de cultivo de embriones de cancerina *in vitro*. Y para la etapa de multiplicación, la siembra de yemas axilares de las plantulitas obtenidas a partir de la germinación de los embriones puesto que no se buscó la clonación sino la multiplicación del material. El objetivo es el rescate de la especie, viéndose favorecida por las posibilidades de recombinación genética que se dan en la formación de los embriones.

6 Para Parra (1987) los reguladores de crecimiento pueden estimular, inhibir o modificar de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas y el tipo de regulador y la concentraciones que deban utilizarse van a depender de la respuesta de cada especie. En el caso de la cancerina, estadísticamente el 2iP resultó ser el mejor regulador para el aumento de longitud del inóculo y la multiplicación, según se muestra en las tablas 1,2,3. Sin embargo el regulador mencionado presentó problemas serios al ser utilizado, provocando la muerte de la mayoría de los inóculos y las concentraciones más tóxicas fueron 30 y 100 mgL<sup>-1</sup>. Los síntomas presentados fueron: rompimiento de la epidermis a lo largo del tallo y brotes con proliferación de masas de células suaves en algunos

lugares en donde se presentaban los rompimientos y en las yemas axilares de la hojas.

Cabe señalar que el trabajo con esta especie es pionero por lo cual no podemos compara los resultados obtenido con bibliografía alguna.

6 Cuando los inóculos se pasaron a sales básicas de Murashige y Skoog (1962) únicamente, hubo respuesta positiva, disminuyendo los síntomas descritos aquí y hubo recuperación del material.

El análisis de datos obtenidos de los materiales sometidos a tratamientos con 2ip, fueron hechos tomando en cuenta el crecimiento de los inóculos que no murieron y el número de brotes producto de éstos.

Del papel de los reguladores en la etapa de multiplicación podemos decir que: la multiplicación de "cancerina" *in vitro*, es posible utilizando reguladores tales como 2ip en concentraciones de 10 y 30  $\text{mgL}^{-1}$  y cinetina con 10, 30 y 3  $\text{mgL}^{-1}$ . Sin embargo el mejor de ellos es la cinetina con la concentración de 10  $\text{mgL}^{-1}$ . Ya que el 2ip aunque con un buen efecto sobre la multiplicación y el crecimiento del inóculo, dañó al explante provocando la muerte.

Quedo evidente que el máximo incremento en el crecimiento de los inóculos, para los reguladores probados (2iP, BA. K ) se dió a partir de la segunda semana de siembra y después de esta segunda semana cayo la curva. Sólo en raras excepciones como en BA 30 y 10 mgL<sup>-1</sup> despues de la tercer semana se activó nuevamente el crecimiento del inóculo ( ver gráficas 2 y 3).

El objetivo de este trabajo fue la multiplicación de cancerina y podemos ver en las gráficas 1,2, y 3 que de los reguladores probados, los mejores resultados estan dados por cinetina y 2ip y que de los 2 fué ligeramente superior la respuesta de los inóculos al 2ip.

Desde nuestro punto de vista este elemento y el hecho de que el 2iP sea un regulador costoso, así como lo tóxico que fué para los inóculos nos hace que concluyamos que el mejor regulador para la etapa de multiplicación de la cancerina, es la Cinetina.

## VII. CONCLUSIONES.

El cultivo de tejidos para la multiplicación de cancerina Hippocratea excelsa H.B.K., es una buena alternativa para la propagación clonal de esta especie.

Es posible tener una buena multiplicación al germinar in vitro embriones de cancerina que pueden ser utilizados para el cultivo de yemas axilares, logrando así establecer cultivos asépticos.

Es factible el cultivo de yemas axilares, su brotación y su multiplicación, utilizando  $.3 \text{ mgL}^{-1}$  de AIA combinado con: 1) 2ip en concentraciones de 10 y  $30 \text{ mgL}^{-1}$ , 2) con cinetina en concentraciones de 3, 10 y  $30 \text{ mgL}^{-1}$  y 3) el BA con una concentración de  $10 \text{ mgL}^{-1}$ .

El tiempo óptimo de duración de los inóculos en el medio de multiplicación es de 3 semanas, después de este tiempo no hay cambios significativos en el crecimiento del inóculo ni en la generación de brotes.

Es difícil establecer el método de estacado para esta especie, de las 80 estacas establecidas en invernadero, ninguna enraizó, aunque hay que decir que después de 5 meses 4 tuvieron brotes únicamente.

## VIII. RECOMENDACIONES.

La cancerina es un recurso natural de colecta, de ahí que su propagación por los métodos tradicionales como estacado, acodo, injerto y esquejes, no han sido aplicados a esta especie o al menos no hay reporte de ello.

Con este trabajo se ha demostrado que su propagación es posible a través de la técnica de cultivo de tejidos, sin embargo recomendamos para trabajos subsiguientes se trate de eliminar al patógeno que se presenta al cultivar yemas axilares de cancerina. Para lo cual recomendamos establecer cultivos del hongo que se determinó como Alternaria sp y bajo un diseño establecer a que fungicida y bajo que concentraciones es factible eliminar dicho patógeno y tener la planta sana o bien los inóculos asépticos sin sacrificar con ello la posibilidad de propagarlos *IN VITRO*.

También recomendamos buscar el método más adecuado para eliminar la acumulación de etileno en los tubos de ensayo producto del metabolismo de la cancerina (Jackson 1991). En este trabajo se demostró que aereando los tubos en la cámara de flujo laminar ayudaba a este objetivo sin embargo este método es costoso en tiempo invertido y consideramos que a través de otras técnicas como agregar

Nitrato de Plata al medio de cultivo podría ser posible eliminar con más eficiencia este problema.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS, G. Fitopatología, Limusa México, P150-153. 1986.
- ALEXOPOULUS, C.S. Introducción a la micología, Edit. Universitaria de Buenos Aires, Pag., 399-423, 1966.
- ANDREAE, W.A. Auxin Metabolism and root growth inhibition, Colloques international du centre national de la recherche scientifique No.123 Regulateurs naturels de la croissance vegetale. Edition du centre national de la Recherche scientifique, 15 Quai Anatole-France Paris, (VIII) 1964.
- BONGA, J.M. Vegetative propagation: Tissue culture and organ culture as an alternative to rooting cuttings, New-Zealand Journal of Forestry Science 4 (2) Pág. 253-260, 1974.
- CALZADA, F. Friedelan 3-ONES and triterpens Quinone Methides From *Hippocratea excelsa* H.B.K. XVI Simposium Internacional de Química de Productos Naturales. Monterrey, N.L. Pág. 27-29, Méx. 1989.
- DE LA ROSA, P.P. Propagación *in vitro* de Canela Tesis Fitotécnica, UACH, Chapingo, Méx. 1988.
- HARTNEY, V.S. Vegetative propagation of *Eucalyptus* *in vitro*, Colloque International sur la culture *in vitro* des essences forestieres, Pág. 175-179, 1981.
- HURTADO, D. Cultivo de Tejidos Vegetales, Trillas, Méx. 1988.
- GAUTHERET, T.J. Culture du tissu cambial, Hebd, C.R. Seanc Acad. Sci. Paris, 198:2195-2196, 1934.
- JACKSON, M.B. et al Ventilation in Plan Tissue Cultures and effects of Poor Aeration on Ethylene and Carbon Dioxide Accumulation, Oxygen Depletion and Development. Department of Agricultural Sciences, University of Bristol. Annals of Botany 67, 229-237, 1991.
- KNAUSS, J.F. y M.E. KANAUSS, Contamination in plant tissue culture, Proc. La State Hortie. Soc, 9(02): 341-343, 1979.

- KONAR, R.N. y R. NAGMANI Tissue culture as a method for vegetative propagation of forest trees, New Zealand Journal of forestry Science 4(2): 279-290, 1989.
- LISS, A.R., Plan tissue and Cell culture, Columbia University, New York, Pág. 57-81, 1987.
- MARTINEZ, O.S. "Busqueda de plantas medicinales con propiedades Insecticidas contra el gusano cogollero del Maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera Noctuidse), Tesis Parasitología, UACH Chapingo 1983.
- MATA SANCHEZ, D. Los extractos acuosos de plantas silvestres como una alternativa para el combate de la conchuela del frijol *Epilachna varivestis* Muls (Coleoptera Coccinallidae). Tesis Parasitología, UACH Chapingo, P39-42 1983.
- MURASHIGE, T. Y T. SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco, Tissue culture Physiology, Pág. 15: 473-497, 1962.
- NKANKA, B *Eucalyptus Rudis* en la Technique de micropropagation por la culture de noeuds *in vitro*, colloque international sur la culture *in vitro* des essence forestieres Pág. 135-142, 1981.
- PACHECO, C.J. Busqueda de sustancias tóxicas en plantas medicinales, contra larvas de mosquito casero: *Culex quinquefasciatus* (Diptera Culicidae). Tesis Profesional. Depto de Parasitología Agrícola UACH, 1983.
- RODRIGUEZ, H.C. Actividad insecticida de *Cancerina* (*Hippocraea excelsa*: Hippocraceae) en siete especies de insectos de importancia económica", XXV Congreso Nal. de Entomología. Oax. Méx. Pág. 10, 1990).
- SHIELDS, R. 'Use of fungicides in plant tissue culture, Plant Cell Reports, Springer-Verlag 1984.

- SISLER AND CARROLL Physiology of fungitoxicity, Plant Pathology, Husfal Dimeno Academic Press, New York and London, 1960.
- STANDLEY, P.C. "Trees and Shrubs of México Cant U.S. Nat. Herb XXIII, 1926.
- STRET, R. Plant Tissue and Cell Botanical Monograph Vol. 11 University of California 1977.
- TAKEUCHI, M. GONZALEZ, H. MADRIGAL R., Y VILLALOBOS, Métodos de Cultivo de Tejidos Vegetales, Chapingo, Méx. Ed. Colegio de Postgraduados 1973.
- THORPE, T.A. Frontiers of plant tissue culture, Department of Biology, University of Calgary, Canada, 1978.

X. APENDICES.

**TABLA 1.** Analisis de varianza para el número de brotes tratados con 2iP. Cín y BA.

Fuente de variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Pr.F
Trat.	10	12.377	1.2377	3.25	0.004
Error	464	176.526	0.38044		
Total	474	188.90			

**Tabla 2.** Analisis de varianza para la Longitud de Brotes como respuesta al 2iP. Cín y BA.

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Pr.F
Trat.	10	121.319	12.131	8.0	0.0001
Error	464.312	701.361	1.5115		
Total	474	822.694			

**Tabla 3.** Analisis de varianza para la longitud de los InÓculos como respuesta al 2iP. Cín y BA.

Fuente de variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Pr.F
Trat.	10	375.4406	37.5440	8.06	0.0001
Error	2164.2214	4,694623			
Total	2539.662				