



Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica

“Establecimiento de un protocolo para inducir cultivo de tejidos en *Jacquinia macrocarpa*.”

Informe técnico de residencia profesional

Presenta:

Luis Alberto Ruiz Ramírez

Asesor:

Dr. Federico Antonio Gutiérrez Miceli

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Diciembre, 2014

Índice

1 JUSTIFICACIÓN	1
2 OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo general	2
2.2 Objetivos específicos	2
3 PROBLEMAS A RESOLVER	3
4 FUNDAMENTO TEÓRICO	4
4.1 Familia Theophrastaceae.....	4
4.2 <i>Jacquinia macrocarpa</i> Cav.....	5
4.3 Cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	7
4.4 Explante	9
4.5 Asepsia.....	12
4.6 Medios de cultivo.....	15
4.7 Condiciones ambientales para la incubación.....	17
4.8 Control hormonal del crecimiento y desarrollo <i>in vitro</i>	18
4.9 Formación de callos bajo condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	20
4.10 Bases moleculares para la formación de callos.....	20
5 PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS	21
5.1 Material vegetal	21
5.2 Desinfección de diferentes explantes de <i>Jacquinia macrocarpa</i> e implantación <i>in vitro</i> .	22
5.3 Evaluación de los explantes de <i>Jacquinia macrocarpa</i> después de la implementación <i>in vitro</i>	23
5.4 Inducción a callos mediante reguladores de crecimiento	23
5.5 Germinación de semillas inmaduras de <i>Jacquinia macrocarpa</i>	24
5.6 Cuantificación de metabolitos secundarios en extractos acuosos y metanólicos de las raíces de <i>Jacquinia macrocarpa</i>	24
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	26
6.1 Desinfección de diferentes explantes de <i>Jacquinia macrocarpa</i>	26
6.2 Inducción a callos mediante reguladores de crecimiento.....	32
6.3 Germinación de semillas inmaduras de <i>Jacquinia macrocarpa</i>	35
6.4 Cuantificación de metabolitos secundarios en extractos acuosos y metanólicos de las raíces de <i>Jacquinia macrocarpa</i>	36

7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES	40

1 JUSTIFICACIÓN

El género *Jacquinia* L. pertenece a la familia Theophrastaceae que incluye 6 géneros y aproximadamente 110 especies. Mientras que *Jacquinia* L. incluye alrededor de 33 especies distribuidas en América Central, el Caribe, y América del Sur (Stähl 1989, 1992, 1995; Stähl y Axelrod 1998). En México hay dos especies de *Jacquinia* muy parecidas: *Jacquinia macrocarpa*, distribuida en la selva baja caducifolia y en las zonas sabanizadas de la planicie costera del Golfo de México, desde el norte de Veracruz hasta la península de Yucatán, y *Jacquinia pungens*, que forma parte de las selvas bajas caducifolias de la costa del Pacífico, desde Sonora, hasta Guerrero, Oaxaca y Chiapas, y en la cuenca del Balsas hasta el sur de Puebla; *Jacquinia macrocarpa* difiere en la nervación penninervada, los estambres un poco más cortos y el fruto aproximadamente de 2 cm de diámetro (Pennington & Sarukhán, 2005).

Gonzales y Toledo (2013) reportan que el extracto de las raíces de la planta *Jacquinia macrocarpa*, produjo mortalidad de garrapatas adultas de *R. microplus* durante las primeras 24 h (60 %; $p < 0.05$). De acuerdo con los resultados *in vitro*, se puede comprobar la eficacia de la raíz de *J. macrocarpa* (60 %) como acaricida, lo cual se considera relevante, ya que la FAO (1993) considera eficaz un producto acaricida cuando este presenta un 60 % de muertes en las garrapatas.

La biotecnología vegetal es una de las disciplinas científicas que más desarrollo ha demostrado en los últimos años. Actualmente ofrece una alternativa real para la resolución de un gran número de problemas relacionados con el mejor aprovechamiento de las plantas por parte del hombre. Esta disciplina es sin duda una herramienta invaluable para incrementar tanto la cantidad como la calidad de los alimentos de origen vegetal, así como para obtener nuevos productos con diversas aplicaciones a partir de las plantas.

Por lo anterior, un aspecto interesante en el caso de esta especie, es la ejecución del cultivo de tejidos vegetales, el cual consiste en una serie de técnicas que permiten el cultivo y manipulación, bajo condiciones artificiales y controladas de células, tejidos y órganos vegetales, lo cual nos permitirá desarrollar estudios posteriores en la producción de metabolitos secundarios con efecto acaricida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Analizar el efecto del tipo de explante para obtener material vegetal aséptico que sirva para inducir la producción de callos a través del uso de reguladores de crecimiento vegetal en *Jacquinia macrocarpa*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar el protocolo de desinfección en hojas de *Jacquinia macrocarpa*.
- Determinar el protocolo de desinfección en yemas axilares de *Jacquinia macrocarpa*.
- Determinar el protocolo de desinfección en frutos inmaduros de *Jacquinia macrocarpa*.
- Evaluar el efecto de los regulares de crecimiento en la inducción a callos en los diferentes tipos de explantes de *Jacquinia macrocarpa*.
- Cuantificar los metabolitos secundarios presentes en extractos acuosos y metanólicos de las raíces de *Jacquinia macrocarpa*.

3 PROBLEMAS A RESOLVER

Hace falta la implementación de técnicas de cultivo *in vitro* que permita el estudio posterior de la producción de metabolitos secundarios con efecto garrapaticida, a partir de la especie *Jacquinia macrocarpa*. De tal manera que se pueda solucionar la problemática a nivel mundial ocasionado por las infestaciones de garrapatas en el ganado, las garrapatas pueden causar dermatosis, pérdida de sangre, daño en el cuero del ganado y algunos casos también pueden inocular toxinas. Todo esto provoca una pérdida de peso en el ganado y disminuye la producción de leche, lo que significa una reducción en la producción ganadera. La FAO (2007) reporta el gran impacto económico ocasionado por las garrapatas con pérdidas entre 2000 a 3000 millones de dólares en el mundo.

El estado de Chiapas no está aislado de dicha problemática. Chiapas es un estado considerado como ganadero; recientemente ha tenido un avance importante en las campañas sanitarias. Sin embargo, la situación propia del estado favorece la amplia distribución de las garrapatas entre las que se encuentran las de la especie *Rhipicephalus microplus*, incidiendo directamente en la producción y productividad e indirectamente en la comercialización tanto de ganado como de pieles, representando la resistencia una barrera sanitaria, ya que las garrapatas resistentes pueden sobrevivir en animales bañados que se movilizan a otras explotaciones o regiones. En estudios previos realizados en la región IV Frailesca para conocer la prevalencia de la resistencia al amitraz, organofosforados y piretroides sintéticos se reportó una prevalencia del 60.8% para el amitraz, 77.2% a los organofosforados y 90.8% a los piretroides en la región (Rodríguez et al., 2005).

4 FUNDAMENTO TEÓRICO

4.1 Familia Theophrastaceae

La familia Theophrastaceae incluye 6 géneros y aproximadamente 110 especies. Theophrastaceae pertenece al orden Ericales en el que se agrupa con Maesaceae, Myrsinaceae, Primulaceae, y otras tres familias denominadas “primuloid” (Anderberg y Ståhl, 1995; Anderberg et al. 1998, 2000).

La mayoría de Theophrastaceae son arbustos neotropicales o pequeños árboles que crecen a altitudes por debajo de 2500 m en la temporada seca, así como áreas de bosque lluvioso no temporal. La familia incluye convencionalmente los géneros Theophrasta L. (1737, 1753), Jacquinia L. (1756), Clavija Ruiz y Pavon (1794), Deherainia Decaisne (1876), y Neomezia Votsch (1904). Un sexto género monotípico, Votschia, fue descrito por Ståhl (1993) sobre la base de una antigua especie de *Jacquinia*. Recientemente, Källersjo et al. (2000) amplió la circunscripción de la familia a través de la inclusión del género Samolus. Samolus, con su hábito herbáceo y fruta capsular, es morfológicamente muy diferente de otros Theophrastaceae.

Jacquinia L. incluye alrededor de 33 especies distribuidas en América Central, el Caribe, y América del Sur (Ståhl 1989, 1992, 1995; Ståhl y Axelrod 1998). Estas son típicamente encontradas en formaciones secas como los bosques caducifolios o matorrales espinosos. Una excepción es *J. paludícola*, que crece en bosques pantanosos. Las especies que se incluyen en este género son: *J. aculeata* (desde Cuba hasta La Española), *J. arborea* (Caribe), *J. beterii* (Caribe), *J. flammea* (Yucatán), *J. frutescens* (norte de Colombia y Venezuela), *J. keyensis* (sur de Florida hasta Jamaica), *J. longifolia* (desde Belice hasta Nicaragua), *J. macrocarpa* (desde México hasta Panamá), *J. nervosa* (desde México hasta Costa Rica), *J. paludícola* (desde Belice hasta Guatemala), *J. pauciflora* (Puerto Rico), *J. roiigii* (Cuba), *J. shaferi* (Cuba), *J. stenophylla* (desde Cuba hasta La Española), y *J. umbellata* (desde Cuba hasta Puerto Rico).

4.2 *Jacquinia macrocarpa* Cav.

Taxonomía de *Jacquinia macrocarpa*

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Primulales
Familia	Theophrastaceae
Género	<i>Jacquinia</i>
Especie	<i>macrocarpa</i>
Epíteto específico	<i>pungens</i>
Nombre científico	<i>Jacquinia macrocarpa</i> subsp. <i>pungens</i>
Autor del nombre	A. Gray
Determinador	D. F. Austin

Información general acerca de *Jacquinia macrocarpa*

Nombres comunes. Niño de Dios, armolillo, guayaca, yacuate (Jalisco); pinicua (Sonora); rosadillo (Oaxaca); sacaté (Veracruz); sanjuán (Sinaloa); siqueté (Chiapas); shpat za (Quintana Roo); muyché (Yucatán).

Forma. Árbol de hasta 10 m de alto y d.a.p. de hasta 40 cm, con tronco liso y cilíndrico, con ramas muy ascendente y copa amplia, densa y oscura (Pennington & Sarukhán, 2005).

Corteza. Externa de color pardo grisáceo, con fisuras superficiales pero fuertemente marcadas, de forma cuadrangular. Interna dura, con la parte más externa verde y la más interna amarillo pardusca. Grosor total de la corteza de 3 a 5 mm (Pennington & Sarukhán, 2005).

Madera. Albura de color pardusco claro, dura, con rayos conspicuos (Pennington & Sarukhán, 2005).

Ramas jóvenes. De color moreno oscuro hasta pardo grisáceo, longitudinalmente fisuradas, con algunas lenticelas grandes, de sección transversal circular, glabras, la ramificación es a veces dicótoma o con 3 o más ramitas saliendo del mismo punto (Pennington & Sarukhán, 2005).

Hojas. Yemas de 1 a 2 mm de largo, agudas, rodeadas por numerosas estípulas agudas, pubescentes. Estípulas de 1 a 2 mm de largo, lanceolados, pubescentes, caedizos. Hojas dispuestas en espiral y aglomeradas en las puntas de las ramas, simples; láminas de 2.5 x 0.5 a 6 x 2.6 cm, elípticas, oblanceoladas u obovadas, el margen entero, ápice agudo u obtuso, con una espina de 1 a 2 mm de largo, base aguda; de color verde intenso en ambas superficies, coriáceas, con el nervio marginal muy grueso y nervación fina paralela, glabras; pecíolo de 1 mm de largo, glabro. Los árboles de esta especie poseen hojas en la época seca y las pierden al inicio de las lluvias (Pennington & Sarukhán, 2005).

Flores. En pequeños racimos terminales de 2.5 a 4 cm de largo, glabros; pedicelos de 5 a 9 mm de largo, glabros; flores actinomorfas con olor agradable; cáliz cupular, de 3 a 4 mm de largo, con 5 sépalos ovados, unidos en la base, imbricados, glabros; corola de color rojo o rojo anaranjado, de ca. 1 cm de largo, infundibuliforme, con 5 lóbulos de 3 a 4 mm de largo, redondeados, glabros; estambres 5, opuestos a los lóbulos de la corola, amarillos, insertos e incluidos en el tubo de la corola; anteras amarillas, estaminodios 5, ca. 2 mm de largo, rojos a anaranjados, redondeados, insertos entre los senos de la corola; ovario súpero, glabro, de 2 a 3 mm de largo, con estilo grueso de ca. 2 mm de largo, terminado por un estigma discoide. Florece de enero a mayo (Pennington & Sarukhán, 2005).

Frutos. Baya dura de color pardo grisáceo, de hasta 3 x 2.5 cm, subglobosa o elipsoidea, con el cáliz persistente, ápice redondo con el estilo persistente y muy agudo, base redondeada, lisa, glabra; contiene varias semillas, pardas y pequeñas, inmersas en una pulpa verde. Maduran de febrero a julio (Pennington & Sarukhán, 2005).

Ecología y distribución. Hay dos especies de *Jacquinia* muy parecidas en México: *Jacquinia macrocarpa*, distribuida en la selva baja caducifolia y en las zonas sabanizadas de la planicie costera del Golfo de México, desde el norte de Veracruz hasta la península de Yucatán, y *Jacquinia pungens*, que forma parte de las selvas bajas caducifolias de la costa del Pacífico, desde Sonora, hasta Guerrero, Oaxaca y Chiapas, y en la cuenca del Balsas hasta el sur de Puebla; *Jacquinia macrocarpa* difiere en la nervación penninervada, los estambres un poco más cortos y el fruto ca. 2 cm de diámetro (Pennington & Sarukhán, 2005).

Etnobotánica y antropología. Esta especie se emplea en Quintana Roo para detener el catarro, mediante una infusión hecha con las flores y hojas que se bebe como té. En Sonora se emplean las hojas y las frutas para resolver alteraciones del cuero cabelludo, dolor de oído, mal de los ojos y mareos. En Guerrero, se ocupa en caso de otitis y conjuntivitis sobre animales (Téllez *et al*, 1997).



Figura 1. *Jacquinia macrocarpa* subsp. *pungens*.

4.3 Cultivo de tejidos *in vitro*

La amplitud de la definición de “cultivo de tejidos” y los numerosos objetivos que éstos persiguen constituyen serios escollos en cualquier intento de generalización sobre los factores que afectan el establecimiento de tales cultivos *in vitro*, y obligan a consideraciones previas para delimitar los alcances de los mismos.

En primer término, el cultivo de tejidos *in vitro* comprende, en su acepción amplia, un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. Esta acepción amplia, si bien imprecisa, es actualmente aceptada; sin embargo, existen sugerencias de algunos autores (Street, 1977; Steward, 1983) para restringir su empleo.

En segundo término, los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son numerosos y diferentes. Brevemente, las posibilidades de aplicación de tales cultivos se pueden resumir así: a) estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica, y ciencias afines; b) bioconversión y producción de compuestos útiles; c) incremento de la variabilidad genética; d) obtención de plantas libres de patógenos; e) propagación de plantas; f) conservación e intercambio de germoplasma.

De estas consideraciones surge que el establecimiento de los cultivos de tejidos, es decir, la separación del explante y las operaciones relacionadas con su incubación *in vitro*, dependerá en gran medida del tipo de explante y del sistema de cultivo que se emplee, los que a su vez dependerán del objetivo perseguido. En otras palabras, las técnicas que se emplean para cultivar protoplastos no son exactamente las mismas que se usan para cultivar meristemas; del mismo modo, un determinado sistema de cultivo puede ser de gran utilidad para el logro de un objetivo pero puede no ser útil para otro.

De manera especial se harán consideraciones generales sobre: a) el explante; b) las normas de asepsia; c) los medios de cultivo; d) las condiciones ambientales de incubación; la interacción de estos factores determinará las respuestas que se obtengan *in vitro*, algunas de las cuales se ilustran en la figura 2.

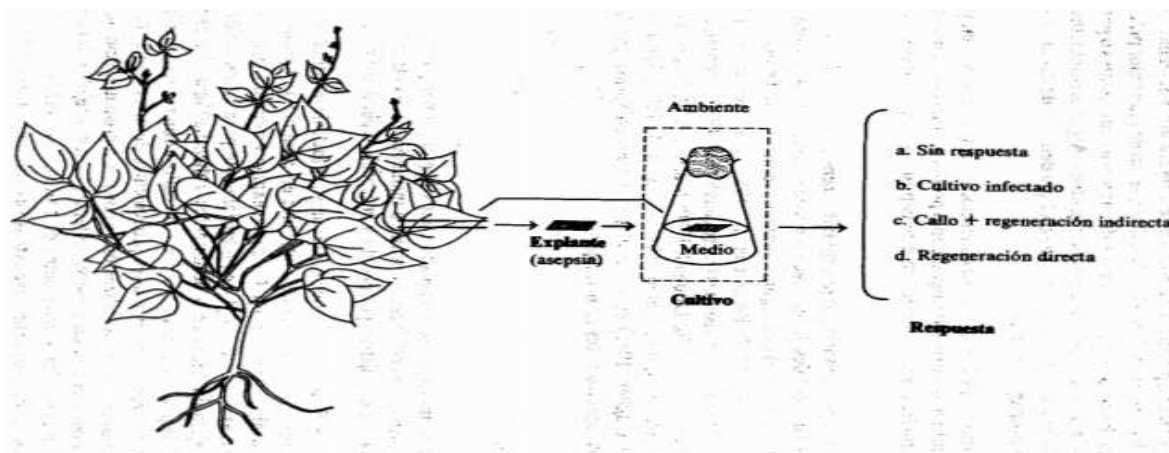


Figura 2. Respuestas morfológicas de cultivos vegetales *in vitro*.

La respuesta obtenida con el cultivo *in vitro* de un determinado explante decidirá sobre su utilidad para el logro de un objetivo propuesto. Es indudable que las respuestas del tipo a o b de la figura son indeseables; pero respuestas del tipo c (proliferación de callos), serán de gran valor práctico para estudios básicos, para la iniciación de suspensiones celulares o para la bioconversión y producción de compuestos útiles. Algunas respuestas del tipo d (proliferación de múltiples vástagos) pueden ser ideales si se pretende micropropagar plantas.

Es necesario recalcar que, para su aplicación en la agricultura, cualquier sistema de cultivo *in vitro* debe lograr como producto final la regeneración de plantas enteras.

4.4 Explante

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada.

Si el objetivo final es la producción de callos, es factible la utilización de una vasta gama de explantes que, cultivados en condiciones apropiadas, permiten la proliferación callosa. Cualquier explante que contenga células nucleadas vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos; por ejemplo, en el caso de numerosas dicotiledóneas herbáceas (figura 3) se puede lograr la proliferación callosa con relativa facilidad mediante la utilización de explantes provenientes de diversas partes del vegetal. Es muy frecuente la utilización de ápices o meristemas caulinares, hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de frutos. Esta facilidad para la proliferación callosa puede hacerse extensiva a células y protoplastos, con el empleo de técnicas y medios de cultivo más elaborados.

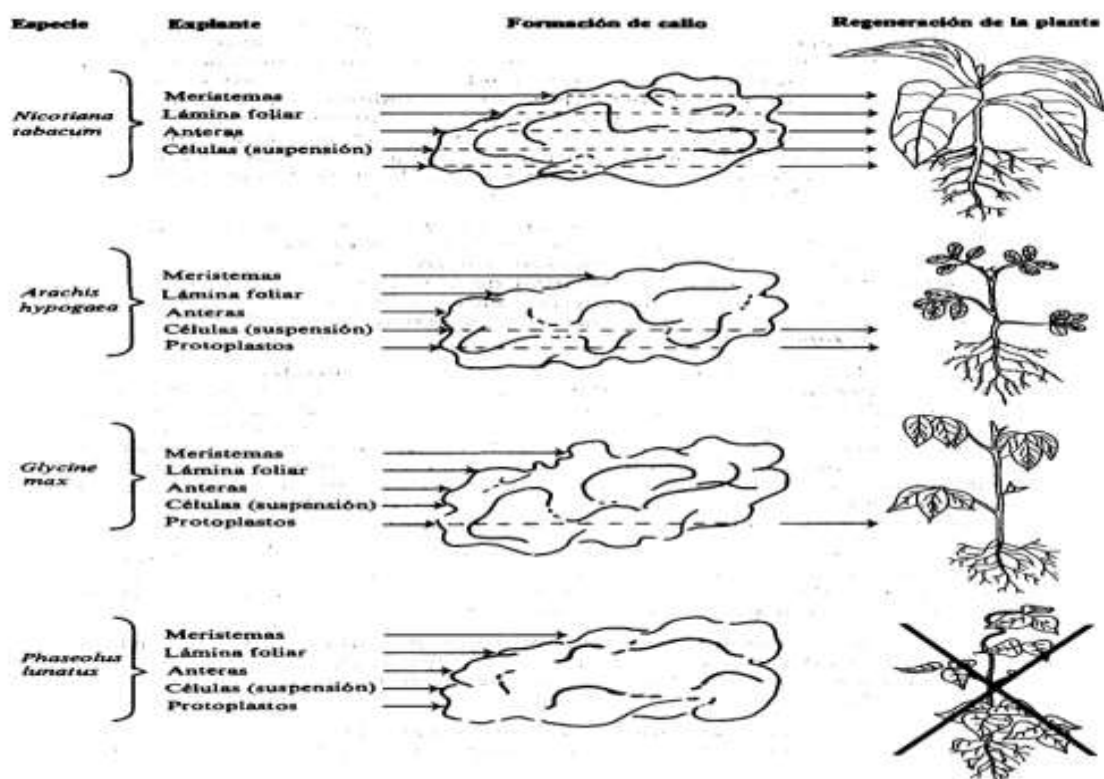


Figura 3. Inducción de callos y regeneración de plantas en el cultivo *in vitro* de diferentes explantes de cuatro especies de dicotiledóneas herbáceas.

En el caso de vegetales en los cuales la obtención de callo no esté limitada por el tipo de explante, éste se seleccionará por razones prácticas como disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad, baja contaminación con microorganismos, y rápida respuesta *in vitro*; es probable que en estos casos se opte por explantes provenientes de plantas jóvenes que crecen en invernaderos, y una alternativa interesante sería usar los provenientes de semillas germinadas en condiciones asépticas. Sin embargo, hay otros vegetales más recalcitrantes en lo que respecta a la obtención de callos, y en estos casos se hace necesario utilizar ciertos explantes; esto ocurre con muchas plantas leñosas y algunas gramíneas.

La elección de un explante apropiado se complica si se pretende la regeneración de plantas a partir de callos. Son pocas las especies que pueden sumarse a *Nicotiana tabacum* (figura 3) en su característica de permitir el uso de una gran variedad de explantes para producir callos capaces de regenerar plantas enteras; entre tales especies se encuentran: *Daucus carota*, *Stylosanthes guianensis*, *Brassica napus*, *Medicago sativa*, y *Trifolium repens*.

El modelo representado en la figura 3 con el maní (*Arachis hypogaea*) muestra que no todos los explantes que producen callos posibilitan la regeneración de plantas. La soya (*Glycine max*) se puede considerar como un excelente ejemplo de la facilidad con que se obtienen callos por cultivo de diferentes explantes, pero en el cual la regeneración de las plantas está limitada al empleo de explantes que contengan meristemas apicales caulinares o laterales; respuestas similares se obtienen en muchas especies de interés económico (entre ellas *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Cicer arietinum*, *Vicia sativa*, *Desmodium canum*, y *Manihot esculenta*).

Por último, la figura 3 muestra el caso de *Phaseolus lunatus*, en el cual es factible inducir el crecimiento calloso pero no se ha logrado aún la regeneración de plantas, a pesar de que se han ensayado unas 40 variantes que involucran medios y sistemas de cultivo.

Es de esperar que futuras investigaciones permitan ampliar la lista de especies vegetales que se ajusten al modelo representado en el tabaco, para aumentar así las posibilidades de aplicación de las técnicas del cultivo *in vitro* de tejidos.

El establecimiento de cultivos que persiguen determinados objetivos puede limitar aún más la elección del tipo de explante. Para la obtención de haploides se cultivan anteras y, en menor medida, inflorescencias, microsporas u ovarios; también con el mismo objetivo se pueden cultivar en el caso de la cebada embriones haploides derivados del cruzamiento de *Hordeum vulgare* x *H. bulbosum* (Jensen, 1977; Yeung et al., 1981). Para la obtención de plantas libres de patógenos se cultivan meristemas, lo mismo que para la conservación de germoplasma.

En relación con la especie vegetal utilizada, es importante tener en cuenta la variabilidad asociada con el genotipo de las plantas. Es muy frecuente que, en idénticas condiciones de medio y ambiente, las respuestas *in vitro* del cultivo de un determinado explante de una especie difieran con el cultivar empleado. Entre cultivares de mandioca o yuca (*Manihot esculenta* Crantz) se encuentran diferencias hasta de 100% en el peso seco de los callos (Rey *et al.*, 1980), y en el pimiento (*Capsicum annuum*) tales diferencias llegan hasta 250%.

También se aprecian diferencias en la regeneración de plantas por cultivo de hojas jóvenes entre cultivares de maní (*Arachis hypogaea*) (Mroginski *et al.*, 1981; Pittman *et al.*, 1983) y arveja (*Pisum sativum*) (Rubluo *et al.*, 1982), como también por cultivo de discos foliares de *Lycopersicon esculentum* (Frankenberger *et al.*, 1981). Otros buenos ejemplos son el cultivo de meristemas de frutilla o fresa (*Fragaria x ananassa*) (Boxus *et al.*, 1977) y el cultivo de anteras de trigo (*Triticum vulgare* L.) (Clapham, 1977). En cultivos *in vitro* de alfalfa (*Medicago sativa*) las respuestas varían con el cultivar (Bingham *et al.*, 1975), e inclusive hay diferencias entre plantas de un mismo cultivar (Kao *et al.*, 1980).

Ligeros cambios en la composición de los medios de cultivo, especialmente en lo que se refiere a los reguladores de crecimiento, pueden ser de utilidad para obviar este efecto del genotipo del material vegetal.

Las respuestas de los explantes cultivados *in vitro* pueden variar notablemente con el estado de desarrollo y edad ontogénica de los mismos. El éxito en la obtención de plantas haploides por cultivo de anteras depende en gran medida de su estado de desarrollo al momento de su cultivo (Mroginski, 1975; Sunderland, 1974). La propagación *in vitro* de la mayoría de las plantas leñosas requiere de la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles (Bonga, 1980; Dodds, 1983); en plantas herbáceas como el maní o la arveja, la regeneración de plantas a partir de hojas está limitada al empleo de explantes jóvenes (Mroginski *et al.*, 1981; Rubluo *et al.*, 1982).

El tamaño del explante es otro aspecto que se debe tener en cuenta para el establecimiento de los cultivos; cuanto más grande sea, mayores son las posibilidades de obtener proliferación callosa, aunque ello trae aparejadas mayores probabilidades de heterogeneidad y de contaminación con microorganismos. Existe un tamaño mínimo del explante, variable según el material vegetal, por debajo del cual no se obtienen proliferación callosa u otras respuestas deseables.

El efecto del tamaño del explante puede apreciarse en cualquier sistema de cultivo e independientemente de la fuente de donde proviene dicho explante; su importancia ha sido señalada en cultivos de meristemas (Hu *et al.*, 1983), anteras (Xu *et al.*, 1982), suspensiones celulares (Street, 1977), embriones (Monnier, 1976) y protoplastos (Kao *et al.*, 1980). En

general, el cultivo de explantes muy pequeños requiere el empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados (Street, 1977); otra alternativa es el cultivo de varios explantes en un mismo recipiente, en lugar de su incubación en forma individual.

Se debe tener en cuenta la incidencia de otros factores que a menudo pueden alterar las respuestas de los explantes cultivados; entre estos factores están la época del año en que se realizan los cultivos, especialmente cuando los explantes se obtienen de plantas de invernadero o campo. Otro factor serían los pretratamientos a los explantes y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes de los mismos.

4.5 Asepsia

La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su ulterior incubación y manipulación.

Es difícil lograr cultivos completamente estériles en el estricto sentido de la palabra; por ejemplo, es probable que los virus presentes en el explante persistan en los cultivos. Hecha esta salvedad, para establecer cultivos asépticos es conveniente o necesario: a) Trabajar en ambientes adecuados; b) Esterilizar los medios de cultivo; c) Desinfectar superficialmente los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos; y d) Realizar los cultivos respetando ciertas normas de asepsia.

Hasta una vasta gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, pero en la actualidad es casi generalizada el empleo de etanol (70% v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1% al 3% contenido en productos de uso doméstico (agua de lavandina). Con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio [$\text{Ca}(\text{OCl})_2$, 6% al 12%] y el cloruro de mercurio (HgCl_2 , 0.1% al 1.5%), aunque hay que recalcar que este compuesto es altamente tóxico y que no es fácilmente removible del explante.

En algunos casos resulta útil el agregar algún agente tensoactivo (por ejemplo, Tween-20, del 0.01% al 0.1%), pero puede ser innecesario en los procedimientos de desinfección que incluyan un primer paso con etanol 70%. Asimismo, es conveniente agitar (80-150 rpm) el explante conjuntamente con la solución desinfectante.

Después de tratar el explante con las soluciones desinfectantes es necesario remover de él los restos del producto, mediante varios lavados con agua destilada estéril y operando en la

cámara de transferencia. Es aconsejable lavar los explantes con un volumen por lo menos 10 a 20 veces mayor de agua estéril, haciendo un mínimo de tres enjuagues sucesivos.

Los antibióticos aplicados al medio de cultivo pueden ser de utilidad para la desinfección de los explantes. Sin embargo, en general su empleo solamente se justifica en casos de excepción y en cultivos de corta duración, ya que la alta especificidad de los antibióticos implica que no previenen la proliferación de todos los microorganismos; además, tales productos modifican la composición de los medios de cultivo y pueden ser metabolizados por los explantes.

El procedimiento para la desinfección superficial de los explantes debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible para los explantes. No es factible recomendar un procedimiento general para este propósito, y se deben considerar de manera especial las especies vegetales y el tipo de explante.

En el cuadro 1 se incluyen varios procedimientos utilizados para la desinfección de explantes. Es interesante observar que, si bien en ocasiones se emplea sólo etanol, o solamente NaOCl, lo más frecuente es la utilización de ambos, es decir, una inmersión (generalmente de corta duración) en etanol 70% seguida de una de NaOCl y de varios lavados con agua estéril.

Cuadro 1. Algunos ejemplos de los procedimientos que se usan para la desinfección de explantes.

Parte vegetal desinfectada	Explante cultivado	Especie	Tratamiento desinfectante ^a			Referencia
			En etanol 70% (seg.)	En NaOCl		
				(%)	(min.)	
Apices caulinares	Meristema	<i>Lycopersicon esculentum</i>	—	1.2	10	Kartha et al., 1977
	Meristema	<i>Manihot esculenta</i>	10	0.8	10	Rey et al., 1978
	Hoja joven	<i>Ilex paraguariensis</i>	60	2.0	15	Rey, no publicado
Inflorescencias	Antera	<i>Arachis hypogaea</i>	10	0.8	5	Mroginski et al., 1979
	Antera	<i>Oryza sativa</i>	4	—	—	Oono, 1981
	Ovario	<i>Paspalum alium</i>	—	0.8	10	Bovo et al., 1983
Frutos	Ovulo	<i>Carica papaya</i>	—	2.0	20	Litz et al., 1981
	Nucela	<i>Citrus spp.</i>	—	0.5	10	Evans et al., 1981
Hojas	Lam. foliar	<i>Stylosanthes guianensis</i>	—	1.2	20	Mroginski et al., 1981a
	Lam. foliar	<i>Lycopersicon esculentum</i>	—	1.2	10	Kartha et al., 1976
Semillas	Cotiledón	<i>Lotononis bainesii</i>	—	1.6	10	Bovo et al., no publicado
	Meristema	<i>Coffea arabica</i>	—	1.2	20	Kartha et al., 1981a
Tallo	Médula	<i>Nicotiana tabacum</i>	20	2.0	30	Reinert et al., 1982
Raíz tuberosa	Raíz tuberosa	<i>Daucus carota</i>	—	2.0	30	Reinert et al., 1982

a. En todos los ejemplos, los explantes se lavan finalmente varias veces con agua estéril, con excepción de las inflorescencias de *Oryza sativa*; seg. = segundos; mín. = minutos; Lam. = lámina.

Otros procedimientos incluyen una doble desinfección, como ocurre con el cultivo de hojas jóvenes del maní (*Arachis hypogaea*) (Mroginski et al., 1981). En este caso las semillas se sumergen en etanol al 70% (10 segundos), luego en NaOCl al 1.2% (10 minutos), y posteriormente se lavan y se ponen a germinar asépticamente. A los 3-5 días, las plántulas

resultantes se desinfectan con NaOCl al 0.6% (10 minutos) y después se lavan con agua destilada estéril; luego se retiran de ellas las hojas jóvenes para los cultivos. Un procedimiento similar se utilizó en arveja (*Pisum sativum*) (Mroginski et al., 1981).

Algunos procedimientos emplean la preincubación de los explantes. En el caso de las hojas del café, se desinfectan con $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ al 1% (15 minutos), se lavan con agua estéril y se cortan en pequeños trozos que se incuban en una solución salina (sales de Murashige et al., 1962, diluidas a la mitad) y sacarosa; al cabo de 48 horas se seleccionan los explantes no contaminados y que mantienen la coloración normal, para establecer los cultivos (Sondahl et al., 1979). Litz et al. (1979) emplearon un procedimiento similar para la desinfección de pecíolos de *Carica stipulata*. Los ápices caulinares del manzano utilizados en micropropagación se desinfectan levemente, se incuban por 24 horas en el medio de cultivo, se desinfectan de nuevo, y se cultivan (Jones et al., 1977).

Los explantes provenientes de vegetales que crecen en invernaderos o en cuartos climatizados son relativamente más fáciles de desinfectar que los provenientes de plantas que crecen en el campo; también es más fácil la desinfección de explantes de órganos jóvenes que la de explantes provenientes de materiales adultos. Las aplicaciones de fungicidas o bactericidas, aplicadas previamente a las plantas, pueden ser de utilidad.

Por asepsia en el establecimiento y ulterior manipulación de los cultivos es preciso adoptar algunas precauciones durante las tareas que se llevan a cabo en la cámara de transferencia, así:

- 1) Antes de comenzar a trabajar, desinfectar la mesa y las paredes de la cámara con etanol 70%. Igualmente es conveniente desinfectar la parte externa de los recipientes que contienen los medios de cultivo o el agua estéril, antes de introducirlos en la cámara.
- 2) Es necesario que las manos y, eventualmente, los antebrazos del cultivador sean desinfectados con etanol 70%. El uso de máscaras y gorros no es imprescindible, pero reduce la contaminación si se opera en flujos laminares de aire estéril.
- 3) Los instrumentos metálicos empleados se deben flamear previamente con etanol 95%. El material de vidrio utilizado como soporte para las disecciones (generalmente cajas Petri) debe estar esterilizado al igual que las pipetas que comúnmente se usan en trabajos con suspensiones celulares y protoplastos.
- 4) Realizar las operaciones de transferencia y disección lo más cerca posible a la llama de un mechero. Evitar exposiciones prolongadas de los explantes o de los medios de cultivo en recipientes abiertos.

4.6 Medios de cultivo

Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo *in vitro* de un determinado explante, es necesario elegir un medio apropiado de cultivo, en el cual hay que considerar no sólo sus componentes sino su preparación.

En la actualidad existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran:

- a) Carbono.
- b) Nutrimientos minerales.
- c) Vitaminas.
- d) Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos).
- e) Sustancias reguladoras del crecimiento.
- f) Otros compuestos.

Generalmente se hace referencia al conjunto de componentes a+b+c como al medio basal (MB), y algunas de sus formulaciones se encuentran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Composición de cuatro medios básicos (MB) para el cultivo *in vitro* de tejidos.

Componentes	Contenidos en cada medio (mg/litro) ^a			
	MS	B5	N6	Wh
NH ₄ NO ₃	1650	—	—	—
KNO ₃	1900	2500	2830	80
KH ₂ PO ₄	170	—	400	—
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	150	166	—
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	250	185	737
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	134	463	—
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	—	—	—	288
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	—	150	—	19
KCl	—	—	—	65
Na ₂ SO ₄	—	—	—	200
KI	0.83	0.75	0.80	0.75
H ₃ BO ₃	6.20	3.00	1.60	1.50
MnSO ₄ ·H ₂ O	—	10.00	—	—
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.30	—	4.40	6.65
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60	2.00	1.50	2.67
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	—	—
H ₂ MoO ₄	—	—	—	0.001
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025	—	0.01
Fe ₂ (SO ₄) ₃	—	—	—	2.50
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.80	27.80	27.85	—
Na ₂ EDTA	37.30	37.30	37.25	—
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025	—	—
Glicina	2.00	—	2.00	3.00
Tiamina-HCl	0.10	10.00	1.00	0.10
Piridoxina-HCl	0.50	1.00	0.50	0.10
Acido nicotínico	0.50	1.00	0.50	0.50
Micinositol	100.00	100.00	—	100.00
Sacarosa	30,000	20,000	50,000	20,000
pH	5.7	5.5	5.8	5.5

a. MS = Murashige et al., 1962; B5 = Gamborg et al., 1968; N6 = Chu et al., 1975; Wh = White, 1943. Con modificaciones de Yeoman et al., 1977 y Singh et al., 1981.

Fuentes de carbono. Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2% a 5%) es el azúcar que más se utiliza, y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructuosa; en general, la maltosa y la galactosa son menos efectivas. La incorporación de mioinositol al medio (100 mg/litro) generalmente da como resultado un mejor crecimiento de los callos y suspensiones celulares.

Nutrientes minerales. Cualitativamente los medios de cultivo aportan los mismos elementos (macro y micronutrientes) que se consideran esenciales para el crecimiento de plantas enteras. En los medios de reciente desarrollo (MS, B5, N6) cabe destacar las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio con respecto al medio de White (cuadro 2). El nitrógeno se suministra en forma de nitrato y amonio; aunque los cultivos pueden prosperar con solo nitrato o solo amonio como fuente nitrogenada, en este último caso el medio debe contener también ácido cítrico, succínico o málico. Otras fuentes de nitrógeno incluyen glutamina, urea y caseína hidrolizada (CH).

Los medios de cultivo contienen fósforo, calcio, magnesio y azufre en concentraciones de 1 a 3 mM. La adición de hierro conjuntamente con un agente quelante (Na_2EDTA) lo hace disponible en un amplio rango de pH.

Vitaminas. Si bien los medios de cultivos contienen comúnmente varias vitaminas, es probable que en forma general sólo sea esencial la incorporación de tiamina.

Agente gelificante. En los medios semisólidos comúnmente se adiciona agar (0.6% a 1.0%). Se debe considerar especialmente la pureza del agar, ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variada; la marca comercial y las concentraciones del agar utilizado pueden alterar las respuestas *in vitro* de los cultivos (Debergh, 1982).

Reguladores de crecimiento. En algunos casos se obtienen en los cultivos *in vitro* las respuestas deseadas mediante el empleo del MB sin reguladores de crecimiento; entre otros, es el caso de la obtención de plantas por cultivo de meristemas de *Vigna unguiculata* (Kantha et al., 1981) y por cultivo de anteras de tabaco (Nitsch, 1969). Sin embargo, en la mayoría de los casos se hace necesario agregar al medio sustancias reguladoras de crecimiento, generalmente del tipo de las auxinas o las citocininas.

Las auxinas que más se utilizan en el establecimiento de los cultivos son: 2,4-D, ANA, AIA, y AIB; las citocininas que más se emplean son: KIN, BAP, y ZEA.

Las giberelinas, especialmente el AG_3 , han demostrado ser necesarias para el cultivo de ápices o meristemas caulinares de varias especies vegetales como *Phaseolus vulgaris*,

Solanum tuberosum, *Fragaria x ananassa*, *Manihot esculenta* y otras (Styer et al., 1983). El ácido abscísico (ABA) se emplea en ocasiones.

Otros componentes. Existe una larga lista de componentes que se han adicionado ocasionalmente a los medios de cultivo, como fuentes de nitrógeno reducido, factores de crecimiento, carbohidratos, y otros. Entre ellos están el agua de coco, AC, (5% a 15% v/v), el jugo de frutos de tomate, el extracto de levadura, y el extracto de tubérculos de papa.

Además de glicina, en ocasiones se incorporan al medio otros aminoácidos como asparagina, cisteína y L-tirosina. En general, no son constituyentes esenciales de los medios e inclusive, en concentraciones relativamente altas, pueden tener efectos inhibitorios sobre los cultivos.

En algunos medios se adicionan ácidos orgánicos como el cítrico, el málico, el succínico y el pirúvico, como precursores de aminoácidos; también es frecuente la adición de L-glutamina y de caseína hidrolizada (0.1% a 1%).

El empleo de sustancias antioxidantes (ácido ascórbico, L-cisteína, polivinilpirrolidona) puede ser de utilidad para el cultivo de explantes con alto contenido de polifenoles, cuya oxidación produce oscurecimiento y eventual muerte de los explantes. En estos casos también es útil usar las soluciones antioxidantes durante la preparación del explante, como también incubar los cultivos en la oscuridad o a bajas intensidades de luz. También se suele acortar el intervalo de tiempo entre subcultivos, como un medio para disminuir los efectos nocivos de la oxidación de polifenoles.

El carbón activado (0.1% a 5%), incorporado al medio, ha mostrado ser de utilidad en el cultivo de diferentes explantes, posiblemente para absorber metabolitos tóxicos.

4.7 Condiciones ambientales para la incubación

Es conveniente que los cultivos sean incubados en ambientes controlados, por lo menos en lo que se refiere a la luz y a la temperatura; estos dos factores están relativamente poco estudiados, y la información existente sobre ellos suele ser fragmentaria y a menudo contradictoria.

Las respuestas morfogénicas pueden ser alteradas por la temperatura de incubación (Martin, 1980; Hughes, 1981), así como por la calidad, intensidad y duración de la luz (Seibert et al., 1980; Hughes, 1981). El cuadro 3 ilustra los efectos de algunos factores sobre la regeneración de plantas a partir de diferentes explantes de algunas leguminosas.

Cuadro 3. Efecto de la intensidad de la luz y de la temperatura en la regeneración de plantas por cultivo *in vitro* de meristemas y hojas.

Luz ^a (lux)	Temperatura ^b (°C)	Explantos ^c que regeneran plantas o vástagos (%) en:		
		<i>Pisum sativum</i> (hoja joven)	<i>Vigna unguiculata</i> (meristema)	<i>Glycine max</i> (meristema)
0	26/26	0	—	—
0	20/20	0	—	—
0	26/15	0	—	—
0	20/15	0	—	—
1000	26/26	8	—	—
1000	26/20	39	—	—
1000	26/15	17	—	—
1000	20/15	22	—	—
2000	26/26	14	—	—
2000	20/20	41	—	—
2000	26/15	30	—	—
2000	20/15	54	—	—
1200	26/26	—	75	7
1200	20/15	—	38	17
7500	26/26	—	100	35
7500	20/15	—	—	8

a. Fotoperíodo de 16 horas.

b. Numerador = temperatura durante el fotoperíodo; denominador = temperatura durante el escotoperíodo.

c. El símbolo (—) indica tratamientos no ensayados.

FUENTES: Rubluo et al., 1982 (para *P. sativum*); Kartha et al., 1981b (para *V. unguiculata* y *G. max*).

Para propósitos generales se sugiere utilizar, en el establecimiento de los cultivos, una fuente luminosa compuesta de lámparas fluorescentes (del tipo “luz de día”) y lámparas incandescentes que brinden entre 1000 y 4000 lux de iluminación. Comúnmente se utiliza un ciclo de fotoperíodo/escotoperíodo de 16/8 horas. En general, temperaturas entre 25 y 28 °C son adecuadas para el establecimiento de los cultivos.

4.8 Control hormonal del crecimiento y desarrollo *in vitro*

El desarrollo de cualquier tejido vegetal es un proceso sumamente complejo en el cual interviene un gran número de factores externos e internos cuyos mecanismos precisos de acción en muchos casos aún no están claros. Entre los factores internos que controlan el desarrollo de los diferentes tejidos de una planta destacan los llamados reguladores del crecimiento vegetal (RCV), también conocidos como hormonas vegetales o fitohormonas.

Los RCV son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta, que en muy pequeñas cantidades alteran el crecimiento o los patrones de desarrollo de los tejidos vegetales.

Los RCV se clasifican en 5 grupos básicos dependiendo de su estructura química y su efecto fisiológico: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Actualmente se han aislado y estudiando otras sustancias fuera de estos grupos, que podrían ser también consideradas como RCV, como por ejemplo las poliaminas, jasmonatos, ácido salicílico y los brassinoesteroides (Davies, 1995).

Hasta hace pocos años se tenía la creencia de que la mayoría de los fenómenos relacionados con el desarrollo de los vegetales podían ser explicados sobre la base de simples cambios en las concentraciones y tipos de estos compuestos presentes en un tejido. Actualmente se sabe que el papel de la concentración de estos compuestos en un tejido, aunque importante, no es tan determinante como llegó a suponerse, pues hay otro tipo de consideraciones a tomar para explicar el proceso del desarrollo en las plantas. A pesar de lo anterior, los RCV tienen aún una gran importancia en campos como la agricultura, donde poseen un buen número de aplicaciones prácticas. Otro campo en donde destaca el uso de los RCV es el cultivo de tejidos vegetales, ya que mediante el manejo de los tipos, concentraciones y combinaciones de estos compuestos en un medio de cultivo se pueden manipular hasta cierto grado los patrones de desarrollo de los tejidos y obtener las respuestas deseadas como la formación de tejido calloso, brotes, embriones somáticos y raíces. Por lo anterior, el correcto manejo de los RCV en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales suele ser determinante para el éxito o fracaso del sistema.

Al utilizar los RCV en el cultivo de tejidos, se deben tener en mente las siguientes consideraciones:

- La respuesta de un tejido al cultivo *in vitro* es el producto de la interacción de los reguladores del crecimiento endógenos (producidos por el propio tejido) y aquellos exógenos añadidos al medio. De acuerdo a esto, cada tejido puede responder de manera diferente a una misma concentración de reguladores del crecimiento a causa de diferencias en el contenido de reguladores endógenos.
- La respuesta del tejido a los reguladores exógenos depende en gran medida del estado fisiológico particular de dicho tejido, así como de su origen y tipos celulares presentes en el mismo. Cada tejido tiene una determinada “sensibilidad” ante los reguladores del crecimiento, lo que los hace más o menos capaces de responder ante ellos. La sensibilidad puede definirse como la capacidad de respuesta a los RCV y está dada por la cantidad de receptores específicos para los reguladores del crecimiento

presentes en el tejido. Esto también es causante de la respuesta diferente de cada tipo de tejido ante un mismo tratamiento.

- Las concentraciones de RCV que se utilizan normalmente en los medios de cultivo exceden por varias órdenes de magnitud a las concentraciones fisiológicas de estos compuestos en los tejidos. Esto debe ser tomado en cuenta al intentar explicar las respuestas de un tejido *in vivo* mediante observaciones hechas *in vitro*.

4.9 Formación de callos bajo condiciones de cultivo *in vitro*

La aplicación exógena de auxinas y citoquininas inducen a la formación de callos en varias especies de plantas. En términos generales, una relación intermedia de auxinas y citoquininas promueven la inducción de callos, mientras que una alta relación de auxinas a citoquininas o citoquininas a auxinas induce a raíces y a la regeneración de brotes, respectivamente (Skoog and Miller, 1957). Desde el descubrimiento de este sistema de regeneración, este ha sido ampliamente utilizado, por ejemplo, en la propagación de rasgos de importancia económica y a la introducción de transgenes. Otras hormonas, tales como brasinoesteroides o ácido abscísico, también inducen callos y en algunas especies pueden sustituir a las auxinas o citoquininas para la formación de callos (Goren et al., 1979; Hu et al., 2000). Sin embargo, las auxinas y citoquininas han sido por mucho las hormonas más utilizadas y estudiadas en el contexto de la formación de callos y posteriormente en la regeneración de órganos.

4.10 Bases moleculares para la formación de callos

Muchos mutantes deficientes durante la formación de callos se han identificado durante la última década, los análisis genéticos y moleculares de estos mutantes han revelado que la inducción a callos se gobierna a través de complejos mecanismos de regulación (cuadro 4). La progresión del ciclo celular mitótico es suprimida en la diferenciación terminal de las células vegetales, esta apunta a la readquisición de la competencia de proliferación celular como un elemento central de la inducción a callos. La activación de un regulador del ciclo celular de un sólo núcleo, tales como ciclinas (CYCs) o quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), no suele ser suficiente para inducir el callo (Riou-Khamlichi et al., 1999; Cockcroft et al., 2000; Dewitte et al., 2003). En consecuencia, la mayoría de los procesos descritos hasta la fecha para la inducción a callos emplean reguladores transcripcionales o postranscripcionales que causan los cambios globales en la expresión génica o la traducción de proteínas.

Cuadro 4. Lista de genes implicados en la inducción o represión a callos en *Arabidopsis*.

Locus	Common Name	Protein Family	Predicted Function	References
AT2G42430*	<i>LBD16</i>	LOB-domain transcription factor (TF)	Auxin response/lateral root formation	Fan et al. (2012)
AT2G42440*	<i>LBD17</i>	LOB-domain TF	Auxin response	Fan et al. (2012)
AT2G45420*	<i>LBD18</i>	LOB-domain TF	Auxin response/lateral root formation	Fan et al. (2012)
AT3G58190*	<i>LBD29</i>	LOB-domain TF	Auxin response/lateral root formation	Fan et al. (2012)
AT3G16857*	<i>ARR1</i>	GARP TF	Cytokinin response	Sakai et al. (2001)
AT5G07210*	<i>ARR21</i>	GARP TF	Cytokinin response	Tajima et al. (2004)
AT1G12980*	<i>ESR1/DRN</i>	AP2/ERF TF	Cytokinin response/shoot regeneration	Banno et al. (2001)
AT1G24590*	<i>ESR2/DRNL/BCL</i>	AP2/ERF TF	Cytokinin response/shoot regeneration	Ikedo et al. (2006); Marsch-Martinez et al. (2006)
AT1G78080*	<i>WIND1/RAP2.4b</i>	AP2/ERF TF	Wound-induced cell dedifferentiation	Iwase et al. (2011a, 2011b)
AT1G22190*	<i>WIND2/RAP2.4d</i>	AP2/ERF TF	Wound-induced cell dedifferentiation	Iwase et al. (2011a, 2011b)
AT1G36060*	<i>WIND3/RAP2.4a</i>	AP2/ERF TF	Wound-induced cell dedifferentiation	Iwase et al. (2011a, 2011b)
AT5G65130*	<i>WIND4</i>	AP2/ERF TF	Wound-induced cell dedifferentiation	Iwase et al. (2011a, 2011b)
AT1G21970*	<i>LEC1</i>	CCAAT-box binding TF	Embryogenesis	Lotan et al. (1998)
AT1G28300*	<i>LEC2</i>	B3 domain TF	Embryogenesis	Stone et al. (2001)
AT5G13790*	<i>AGL15</i>	MADS box TF	Embryogenesis	Harding et al. (2003)
AT5G17430*	<i>BBM</i>	AP2/ERF TF	Embryogenesis	Boutillier et al. (2002)
AT5G57390*	<i>EMK/AL5/PLT5</i>	AP2/ERF TF	Embryogenesis	Tsuwamoto et al. (2010)
AT1G18790*	<i>RKD1</i>	RWP-RK domain TF	Gametogenesis	Kőszegi et al. (2011)
AT1G74480*	<i>RKD2</i>	RWP-RK domain TF	Gametogenesis	Kőszegi et al. (2011)
AT5G53040*	<i>RKD4</i>	RWP-RK domain TF	Embryogenesis	Waki et al. (2011)
AT2G17950*	<i>WUS</i>	Homeodomain TF	Stem cell maintenance	Zuo et al. (2002)
AT3G50360*	<i>KRP2</i>	CDK inhibitor	Negative regulation of cell proliferation	Anzola et al. (2010)
AT5G48820*	<i>KRP3</i>	CDK inhibitor	Negative regulation of cell proliferation	Anzola et al. (2010)
AT1G49820*	<i>KRP7</i>	CDK inhibitor	Negative regulation of cell proliferation	Anzola et al. (2010)
AT5G49720*	<i>TSD1/KOR1/RSW2</i>	Endo-1,4-β-D-glucanase	Cellulose biosynthesis	Frank et al. (2002); Krupková and Schmölling (2009)
AT1G78240*	<i>TSD2/QUA2/OSU1</i>	S-adenosyl-L-Met-dependent methyltransferase	Pectin biosynthesis (?)	Frank et al. (2002); Krupková et al. (2007)
AT2G23380*	<i>CLF</i>	PRC2	Histone H3 Lys-27 trimethylation	Chanvattana et al. (2004)
AT4G02020*	<i>SWN</i>	PRC2	Histone H3 Lys-27 trimethylation	Chanvattana et al. (2004)
AT4G16845*	<i>VFN2</i>	PRC2	Histone H3 Lys-27 trimethylation	Chanvattana et al. (2004); Schubert et al. (2005)
AT5G51230*	<i>EMF2</i>	PRC2	Histone H3 Lys-27 trimethylation	Chanvattana et al. (2004); Schubert et al. (2005)
AT3G20740*	<i>FE</i>	PRC2	Histone H3 Lys-27 trimethylation	Bouyer et al. (2011)
AT2G30580*	<i>At BMI1A</i>	PRC1	Histone H2A Lys-119 ubiquitination	Bratzel et al. (2010)
AT1G06770*	<i>At BMI1B</i>	PRC1	Histone H2A Lys-119 ubiquitination	Bratzel et al. (2010)
AT2G25170*	<i>FKL</i>	CHD3/4-like chromatin remodeling factor	Histone H3 Lys-27 trimethylation and histone deacetylation (?)	Ogas et al. (1997, 1999)
AT2G30470*	<i>VAL1/HSL2</i>	B3 domain TF	Termination of embryogenesis	Tsukagoshi et al. (2007)
AT4G32010*	<i>VAL2/HSL1</i>	B3 domain TF	Termination of embryogenesis	Tsukagoshi et al. (2007)

*Genes that promote callus formation upon overexpression.
 †Genes that are required to repress callus formation.

5 PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

5.1 Material vegetal

La colecta del material vegetal se efectuó en el municipio de Suchiapa, en el estado de Chiapas en el mes de Julio de 2014, para lo cual se seleccionaron las hojas, yemas axilares y frutos inmaduros de *Jacquinia macrocarpa*.

5.2 Desinfección de diferentes explantes de *Jacquinia macrocarpa* e implantación *in vitro*

- Desinfección de yemas axilares

Las yemas axilares se lavaron con abundante agua corriente y detergente. Posteriormente, se sometieron a una desinfección con agrimicin al 1.0 % (p/v) y captan al 1.0 % (p/v) durante 20 minutos, después de los cuales se enjuagaron con abundante agua destilada estéril. Luego se prosiguió a sumergir los tallos en etanol al 70 % por 10 minutos, al término del tiempo indicado se enjuagaron con abundante agua destilada estéril. Seguidamente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 40% (v/v), para ello se consideraron tres tiempos de exposición 5, 10 y 15 minutos, nuevamente se enjuagaron con abundante agua destilada estéril. Finalmente se sumergieron en cloruro de mercurio al 0.1 % por 10 minutos, después de los cuales enjuagaron las yemas axilares con agua destilada estéril.

- Desinfección de hojas

Las hojas se lavaron con abundante agua corriente y detergente. Posteriormente, se prosiguió a sumergir las hojas en una solución de hipoclorito de sodio al 6 % (p/v), para ello se consideraron tres tiempos de exposición 5, 7 y 10 minutos. Seguidamente se enjuagaron con abundante agua destilada estéril, y se colocaron en etanol al 70 % por 1 minuto, finalmente se enjuagaron nuevamente las hojas con agua destilada estéril.

- Desinfección de semillas inmaduras

Los frutos inmaduros se lavaron con abundante agua corriente y detergente. Posteriormente se prosiguió a sumergir los frutos inmaduros en una solución de hipoclorito de sodio al 6 % (p/v), para ello se consideraron dos tiempos de exposición 10 y 15 minutos. Seguidamente se enjuagaron con abundante agua destilada estéril, y se colocaron en etanol al 70 % por 10 minutos, finalmente se enjuagaron nuevamente los frutos inmaduros con agua destilada estéril.

Después de la implementación de los métodos de desinfección para cada explante de *Jacquinia macrocarpa*, los explantes fueron cultivados en medio Murashige & Skoog (1962) con 3 % de sacarosa y solidificado con 0.25 % de phytigel, con un pH ajustado de 5.7 antes de agregar el phytigel. Los cultivos se incubaron en la cámara de luz artificial a temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ con un fotoperíodo de 16 horas de luz. Se implantaron un total de 4 explantes en cada tratamiento con 4 repeticiones.

5.3 Evaluación de los explantes de *Jacquinia macrocarpa* después de la implementación in vitro

Las evaluaciones se realizaron a las 72 horas de iniciado el cultivo in vitro, en donde se analizaron el porcentaje de contaminación y supervivencia de los explantes. Para evaluar el nivel de fenolización u oxidación, se utilizó la siguiente escala cualitativa: poco fenolizado u oxidado (cuando el 10-40 % del volumen del explante presente algún síntoma de los antes mencionados), medianamente fenolizado u oxidado (cuando el 40-70 % del volumen del explante presente algún síntoma de los antes mencionados), y muy fenolizado u oxidado (para aquellos explantes donde el 100 % de su volumen presente cualquiera de estas señales).

5.4 Inducción a callos mediante reguladores de crecimiento

Después de establecer el mejor protocolo de desinfección para los explantes de *Jacquinia macrocarpa*. Se prosiguió a la adición de reguladores de crecimiento en el medio Murashige & Skoog para la inducción a callos, estos reguladores son 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido naftalen acético (ANA), en los cuales se evaluaron tres concentraciones diferentes mediante un diseño estadístico de superficie-respuesta con un factorial de 3 niveles: 3^2 .

En la tabla 1 se muestra el diseño estadístico de superficie-respuesta para los explantes a partir de hojas. En el cual se analizaron tres concentraciones diferentes (0.55, 1.10, 1.65 μM) de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido naftalen acético (ANA) con dos repeticiones, y además se analizó el efecto de la luz durante el periodo de incubación de los explantes.

Tabla 1. Diseño estadístico de superficie-respuesta para los explantes a partir de hojas.

Con fotoperiodo de 16 horas de luz			Sin fotoperiodo		
Bloque	Concentración de 2,4-D	Concentración de ANA	Bloque	Concentración de 2,4-D	Concentración de ANA
1	0.55 μM	0.55 μM	1	0.55 μM	0.55 μM
1	1.10 μM	0.55 μM	1	1.10 μM	0.55 μM
1	1.65 μM	0.55 μM	1	1.65 μM	0.55 μM
1	0.55 μM	1.10 μM	1	0.55 μM	1.10 μM
1	1.10 μM	1.10 μM	1	1.10 μM	1.10 μM
1	1.65 μM	1.10 μM	1	1.65 μM	1.10 μM
1	0.55 μM	1.65 μM	1	0.55 μM	1.65 μM
1	1.10 μM	1.65 μM	1	1.10 μM	1.65 μM
1	1.65 μM	1.65 μM	1	1.65 μM	1.65 μM
2	0.55 μM	0.55 μM	2	0.55 μM	0.55 μM
2	1.10 μM	0.55 μM	2	1.10 μM	0.55 μM
2	1.65 μM	0.55 μM	2	1.65 μM	0.55 μM
2	0.55 μM	1.10 μM	2	0.55 μM	1.10 μM
2	1.10 μM	1.10 μM	2	1.10 μM	1.10 μM
2	1.65 μM	1.10 μM	2	1.65 μM	1.10 μM
2	0.55 μM	1.65 μM	2	0.55 μM	1.65 μM
2	1.10 μM	1.65 μM	2	1.10 μM	1.65 μM
2	1.65 μM	1.65 μM	2	1.65 μM	1.65 μM

Mientras que en la tabla 2 se muestra el diseño estadístico de superficie-respuesta para los explantes a partir de yemas axilares. En el cual se analizaron tres concentraciones diferentes (1, 2, 3 mg/L) de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido naftalen acético (ANA) con 4 repeticiones e incubados a un fotoperiodo de 16 horas de luz.

Tabla 2. Diseño estadístico de superficie-respuesta para los explantes a partir de yemas axilares.

Bloque	Concentración de 2,4-D	Concentración de ANA	Bloque	Concentración de 2,4-D	Concentración de ANA
1	1 mg/L	1 mg/L	3	1 mg/L	1 mg/L
1	2 mg/L	1 mg/L	3	2 mg/L	1 mg/L
1	3 mg/L	1 mg/L	3	3 mg/L	1 mg/L
1	1 mg/L	2 mg/L	3	1 mg/L	2 mg/L
1	2 mg/L	2 mg/L	3	2 mg/L	2 mg/L
1	3 mg/L	2 mg/L	3	3 mg/L	2 mg/L
1	1 mg/L	3 mg/L	3	1 mg/L	3 mg/L
1	2 mg/L	3 mg/L	3	2 mg/L	3 mg/L
1	3 mg/L	3 mg/L	3	3 mg/L	3 mg/L
2	1 mg/L	1 mg/L	4	1 mg/L	1 mg/L
2	2 mg/L	1 mg/L	4	2 mg/L	1 mg/L
2	3 mg/L	1 mg/L	4	3 mg/L	1 mg/L
2	1 mg/L	2 mg/L	4	1 mg/L	2 mg/L
2	2 mg/L	2 mg/L	4	2 mg/L	2 mg/L
2	3 mg/L	2 mg/L	4	3 mg/L	2 mg/L
2	1 mg/L	3 mg/L	4	1 mg/L	3 mg/L
2	2 mg/L	3 mg/L	4	2 mg/L	3 mg/L
2	3 mg/L	3 mg/L	4	3 mg/L	3 mg/L

5.5 Germinación de semillas inmaduras de *Jacquinia macrocarpa*

Para la obtención de cotiledón, hipocótilos y hojas se germinaron *in vitro* semillas de *Jacquinia macrocarpa*. Dichas secciones de las plántulas de *Jacquinia macrocarpa* se emplearan para estudios posteriores.

5.6 Cuantificación de metabolitos secundarios en extractos acuosos y metanólicos de las raíces de *Jacquinia macrocarpa*

5.6.1 Preparación del material vegetal

Se obtuvieron raíces de *Jacquinia macrocarpa* del municipio de Suchiapa, en el estado de Chiapas en el mes de Noviembre de 2014, dicho material vegetal se sometió a un proceso de secado con una estufa al vacío a una temperatura de 48°C durante 72 horas. Una vez seco el material vegetal se procedió a molerlo en un molino de martillos con una criba de 1mm, finalmente el material vegetal fue almacenado a temperatura ambiente para su posterior utilización.

5.6.2 Obtención de extracto acuoso de *Jacquinia macrocarpa*

Para la preparación del extracto acuoso, se pesaron 1.5 g de material vegetal y se colocaron en un vaso de precipitado, posteriormente se le adicionó 50 ml de agua destilada, este material se mezcló y se hirvió durante 20 minutos, posteriormente se dejó reposar por 24 horas a temperatura ambiente. Ésta se le considero como solución madre. La solución madre se filtró con un papel filtro No. 2 y se almacenó en el refrigerador a 4°C para su posterior utilización.

5.6.3 Obtención de extractos metanólicos de *Jacquinia macrocarpa*

Se pesaron 10g del material vegetal y se colocaron en un matraz Erlenmeyer al cual se le adicionó 225 mL de metanol (Sigma-Aldrich) al 100%, esta mezcla fue sometida a sonicación en un sonicador (Bandelin SONOREX™ Digital 10 P Ultrasonic baths) durante 2 h a temperatura ambiente, la mezcla obtenida se filtró y posteriormente se centrifugó en una centrifuga (Thermo scientific, SHKA® 200) a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se evaporó a vacío en un rotavapor (Rotavapor® R-215) a una temperatura de 45 °C y el residuo se resuspendió en 5 mL de metanol para su almacenamiento a -20°C (Chang & Chern, 2002).

5.6.4 Determinación de Fenoles Totales en el extracto acuoso y metanólico de las raíces de *Jacquinia macrocarpa*

La concentración de fenoles totales fue determinada por el reactivo Folin-Ciocalteau (Sigma-Aldrich), se realizó una curva patrón con las siguientes concentraciones de ácido gálico (Sigma Aldrich): 0, 150, 300, 450, 600, 750, 900, 1050 ppm. A 0.05 mL de muestra se le adicionaron 2.1 mL de agua destilada y 0.25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteau, después se mezcló por un minuto para posteriormente añadir 0.5 mL de una solución de carbonato de sodio (J.T Baker) al 20% y 2.1 mL de agua destilada. La mezcla se dejó en reposo por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. La absorbancia fue observada en un espectrofotómetro (HACH® DR 5000) a 765 nm. Los resultados se expresan en términos de equivalentes de ácido gálico ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) (Singleton et al. 1999).

5.6.5 Determinación de Flavonoides en el extracto acuoso y metanólico de las raíces de *Jacquinia macrocarpa*

A 0.5 mL de muestra diluida se le adicionó 1.5 mL de etanol al 100% (J.T Baker), 0.1mL de cloruro de aluminio (J.T Baker) al 10%, 0.1mL de acetato de potasio (Fluka), 1M y 2.8 mL de agua destilada (HYCEL). Después se incubó a temperatura ambiente por 30min, la absorbancia de la mezcla reaccionante se midió a 415 nm en un espectrofotómetro (HACH® DR 5000). Se preparó una solución patrón de quercetina (Sigma-Aldrich). 10 mL de quercetina se disuelve en etanol (J.T Baker) al 80% y fue diluido a 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70,80 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La cantidad de cloruro de aluminio al 10% se sustituyó por la misma cantidad de agua destilada para el blanco (Chang et al. 2002).

5.6.6 Determinación de Taninos en el extracto acuoso y metanólico de las raíces de *Jacquinia macrocarpa*

La concentración de taninos totales fue determinada a través de una curva patrón con las siguientes concentraciones de catequina (Sigma-Aldrich): 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1 mg/mL. A 1 mL de muestra se le adicionó 2.5 mL de vainillina (J.T. Baker) al 1% en metanol, 2.5 mL de H₂SO₄ (AVANTOR) al 7.2N en metanol (Sigma-Aldrich) a 35°C por 15 minutos. Se analizó a una absorbancia de 500 nm en un espectrómetro (HACH® DR 5000). Los resultados se expresaron en términos de equivalentes de catequina (mg·g⁻¹) (Sherman & Kowalska, 2008).

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Desinfección de diferentes explantes de *Jacquinia macrocarpa*

En el cuadro 5 se observa una comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras entorno al método de desinfección de hojas de *Jacquinia macrocarpa*, con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (HSD) de Tukey.

Cuadro 5. Efecto de la exposición con hipoclorito de sodio al 6% (p/v) a diferentes tiempos (A: exposición por 5 minutos, B: exposición por 7 minutos y C: exposición por 10 minutos) en las hojas de *Jacquinia macrocarpa* durante el método de desinfección, n=4 repeticiones por cada tratamiento.

Tratamiento	Desinfección	Porcentaje de oxidación en las hojas*	Supervivencia del explante*
A	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
B	0.75 ± 0.50 b	37.5 ± 26.30 b	0.75 ± 0.50 b
C	1.00 ± 0.00 b	60.0 ± 8.16 b	1.00 ± 0.00 b
DMS (0.05)	0.462	25.43	0.462

- Para evaluar si existen diferencias entre los tratamientos se asignó el valor de 1.00 (cuando hay un efecto favorable) y 0.00 (cuando hay efecto desfavorable).
- Letras iguales en una misma columna significan que no existen diferencia estadística significativa entre los tratamientos.
- (*) Después de tres semanas.
- DMS= Diferencia mínima significativa.

La figura 4 muestra el diagrama de Tukey que muestra esquemáticamente la supervivencia del explante de acuerdo al método de desinfección en hojas de *Jacquinia macrocarpa*. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

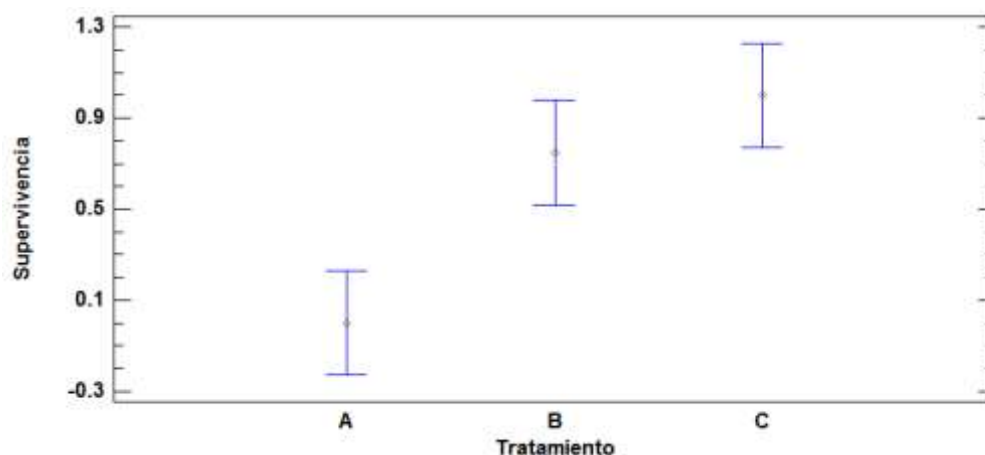


Figura 4. Efecto del método de desinfección sobre la supervivencia del explante a partir de hojas de *Jacquinia macrocarpa*.

Como resultado de la comparación múltiple existen dos tratamientos que muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95% de confianza, estos tratamiento son el tratamiento B y C. Por ello, se eligió al tratamiento B como el método de desinfección para los explantes a partir de hojas de *Jacquinia macrocarpa* dado que en éste el porcentaje promedio de oxidación es menor. Sin embargo, éste no es estadísticamente significativo con relación al tratamiento C.

En el cuadro 6 se observa una comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras entorno al método de desinfección de yemas axilares de *Jacquinia macrocarpa*, con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (HSD) de Tukey.

Cuadro 6. Efecto de la exposición con hipoclorito de sodio al 40% (v/v) a diferentes tiempos (A: exposición por 5 minutos, B: exposición por 10 minutos y C: exposición por 15 minutos) en las yemas axilares de *Jacquinia macrocarpa* durante el método de desinfección, n=4 repeticiones por cada tratamiento.

Tratamiento	Desinfección	Porcentaje de daño en la superficie del explante*	Sobrevivencia del explante*
A	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
B	0.25 ± 0.50 ab	20.0 ± 8.16 b	0.25 ± 0.50 ab
C	0.75 ± 0.50 b	30.0 ± 8.16 b	0.75 ± 0.50 b
DMS (0.05)	0.653	10.66	0.653

- Para evaluar si existen diferencias entre los tratamiento se asignó el valor de 1.00 (cuando hay un efecto favorable) y 0.00 (cuando hay efecto desfavorable).

- Letras iguales en una misma columna significan que no existen diferencia estadística significativa entre los tratamientos.

- (*) Después de un mes.
- DMS= Diferencia mínima significativa.

La figura 5 muestra el diagrama de Tukey que muestra esquemáticamente la supervivencia del explante de acuerdo al método de desinfección en yemas axilares de *Jacquinia macrocarpa*. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

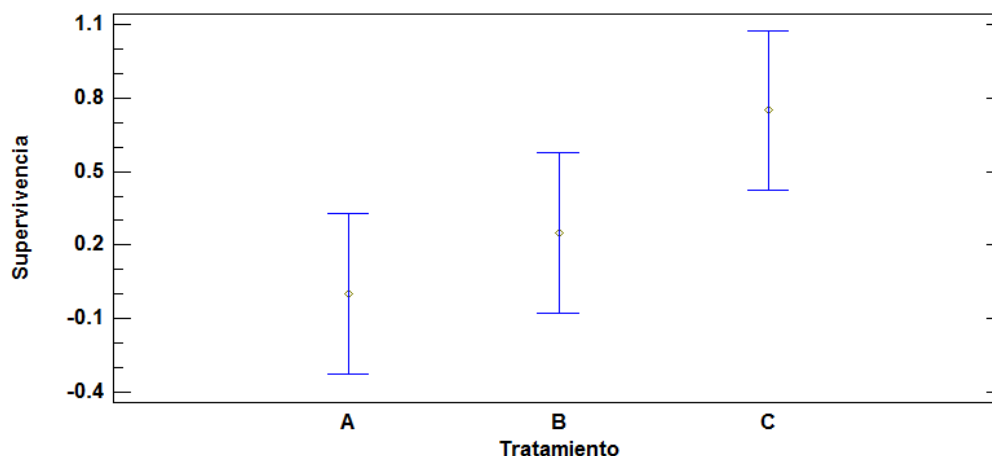


Figura 5. Efecto del método de desinfección sobre la supervivencia del explante a partir de hojas de *Jacquinia macrocarpa*.

Como resultado de la comparación múltiple no existe diferencia estadísticamente significativas entre los tratamientos con un nivel del 95% de confianza. Por ello, se eligió al tratamiento C como el método de desinfección para los explantes de yemas axilares de *Jacquinia macrocarpa* dado que en éste el porcentaje promedio de contaminación es menor. Sin embargo, éste no es estadísticamente significativo con relación a los tratamientos A y B.

En el cuadro 7 se observa una comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras entorno al método de desinfección de frutos inmaduros de *Jacquinia macrocarpa*, con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (HSD) de Tukey.

Cuadro 7. Efecto de la exposición con hipoclorito de sodio al 6% (p/v) a diferentes tiempos (A: exposición por 10 minutos y B: exposición por 15 minutos) en las semillas inmaduras de *Jacquinia macrocarpa* durante el método de desinfección, n=4 repeticiones por cada tratamiento.

Tratamiento	Desinfección	Porcentaje de oxidación en las semillas inmaduras*	Fenolización del medio*	Sobrevivencia del explante*
A	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
B	1.00 ± 0.00 b	55.0 ± 12.91 b	0.75 ± 0.50 b	1.00 ± 0.00 b
DMS (0.05)	0.00	15.79	0.61	0.00

- Para evaluar si existen diferencias entre los tratamientos se asignó el valor de 1.00 (cuando hay un efecto favorable) y 0.00 (cuando hay efecto desfavorable).

- Letras iguales en una misma columna significan que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.

- (*) Después de un mes.

- DMS= Diferencia mínima significativa.

Como resultado de la comparación múltiple existen un tratamiento que muestra una diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95% de confianza, este tratamiento es el tratamiento B. Por ello, se eligió al tratamiento B como el método de desinfección para los explantes a partir de hojas de *Jacquinia macrocarpa*.

Además durante la selección del método de desinfección para semillas inmaduras se observó la germinación de las mismas después de dos semanas de incubación (Figura 6), esto nos permitirá analizar el efecto de los reguladores de crecimiento para la inducción a callos a partir de plántulas.



Figura 6. Plántula de *Jacquinia macrocarpa* germinada después de dos semanas a partir de semillas inmaduras.

El principal problema detectado durante la evaluación de los explantes de *Jacquinia macrocarpa* después de la implantación *in vitro* fue la oxidación presente en los explantes. La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como la oxidación de compuestos fenólicos catalizada por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir

quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Amiot *et al.*, 1996; Bray *et al.*, 2000).

En general, la mayoría de radicales libres se producen a partir del metabolismo del oxígeno y se les llama especies de oxígeno reactivo o intermediarios de oxígeno reactivo (ROS). Estas son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico y típicamente resultan de la excitación del O₂ para formar el oxígeno singulete (¹O₂) o también mediante la transferencia de uno, dos o tres electrones al O₂ para formar el radical súper óxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o radical hidroxilo (HO[•]) respectivamente. En las células vegetales, éstos se forman constantemente durante las reacciones redox de varias vías metabólicas; la incompleta reducción del oxígeno o de la oxidación del agua en el cloroplasto o la mitocondria, en la cadena de transferencia de electrones tanto de la fotosíntesis como de la respiración, en la β-oxidación de los ácidos grasos, oxidación del glicolato, del NADPH, oxalato y de las xantinas (Bray *et al.*, 2000; Mittler, 2002; Turrens, 2003; Apel e Hirt, 2004). Los ROS también se pueden generar en otros organelos celulares, como los peroxisomas y los lisosomas, a consecuencia de los cortes realizados en los explantes (Karp 1998). Adicionalmente, el O₂^{•-} puede reaccionar con el óxido nítrico para formar su radical (NO[•]). Éste y otras formas oxidantes del óxido nítrico (ONOO⁻), nitrosil catión (NO⁺), etcétera. Reciben en conjunto el nombre de especies reactivas de nitrógeno (RNS). El estrés ocasionado por ROS se le conoce como estrés oxidativo y el originario por RNS como estrés nitrosativo (Turrens, 2003; Valderrama *et al.*, 2007).

En condiciones normales de crecimiento la producción de ROS en la célula es baja: 240 μM/s O₂⁻ y 0,5 μM/s de H₂O₂ en los cloroplastos. En situación de estrés, el nivel de O₂⁻ en la célula se incrementa entre los 240-720 μM/s y entre los 5-15 μM/s de H₂O₂ en los cloroplastos (Mittler, 2002). La producción de especies reactivas puede ser activada por inductores específicos (como parte del metabolismo normal de la planta) o también por mecanismos no específicos, por ejemplo en respuesta a un tipo de estrés. Minutos después de la estimulación inicial ocurre, en respuesta, una producción elevada de especies reactivas de oxígeno (Arauz, 1998).

La célula vegetal sometida a un estrés reacciona produciendo mayores niveles de ROS y, o RNS; los cuales generan una reacción en cascada, cuando el electrón libre se transfiere de una molécula a otra. Una de las consecuencias que trae consigo es la acción de enzimas oxidasas, frecuentemente nombradas como polifenol oxidasas (PPOs), fenolasas y tirosinasas, así como de las peroxidasas (POX). Las cuales son liberadas, sintetizadas o están presentes en ciertos sustratos y en condiciones oxidativas cuando los tejidos son lesionados o se encuentran senescentes. En muchos casos, la oxidación se ha relacionado directamente con el acúmulo de PPO y decrecimiento de putrescina, espermidina, y espermina de los tejidos. Los sustratos para estas enzimas, que pueden variar entre los diferentes tejidos, son comúnmente la tirosina o los fenoles. Estas enzimas normalmente se encuentran compartimentalizadas, por ejemplo: PPO en cloroplastos, POX en peroxisomas, o se ubican

en las membranas subcelulares y los sustratos son almacenados dentro de la vacuola. La enzima y el sustrato entran en contacto cuando la célula sufre algún daño, estrés o se encuentran senescente y, generalmente, da como resultado la muerte del explante (Bhat y Chandel, 1991; George, 1996; Vatanpour-Azghandi *et al.*, 2002; Tang y Newton, 2004; Gratão *et al.*, 2005; Pompeu *et al.*, 2008).

En el caso particular del cultivo de tejidos *in vitro*, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (George, 1993; Tabiyeh *et al.*, 2006; Van Staden *et al.*, 2006; Abdelwahd *et al.*, 2008).

Un aspecto interesante se presenta durante la etapa de establecimiento *in vitro*, luego de ser cortados, muchos de los explantes empiezan a perder el color verde e inician un oscurecimiento, liberando frecuentemente exudados oscuros al medio de cultivo, cuya naturaleza no es precisa, aunque se conoce que son una mezcla compleja de sustancias fenólicas (metabolitos secundarios que modulan el desarrollo de la planta y su respuesta a estreses bióticos y abióticos). Por ejemplo, en explantes cultivados de tomate se ha reportado la presencia de vainillina, ácido p-coumárico, p-hidroxibenzaldehído y siringaldehído (Harms *et al.*, 1983; Rao *et al.*, 1985; Abdelwahd *et al.*, 2008). No todos los exudados liberados al medio de cultivo son inhibitorios o tóxicos, pero en la mayoría de los casos el crecimiento del explante es inhibido, perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar y, si no se remedia la situación, puede morir (George, 1996; Ogita, 2005). En *Eucalyptus tereticornis* y *Spondias purpurea*, el problema es tan severo que en torno de pocas horas el explante se oscurece y muere (Das y Mitra, 1990; Azofeifa, 2007).

La toxicidad de los exudados está en relación con el incremento en la producción de compuestos fenólicos ya que estos son oxidados para formar quinonas, debido a la actividad de enzimas oxidativas, y posteriormente polimerizados (Tabiyeh *et al.*, 2006). Además, se puede deber a la oxidación de proteínas, a que fenoles se unan con proteínas mediante puentes de hidrógeno (Harms *et al.*, 1983), a la acción de enzimas peroxidasas, las cuales pueden catalizar su oxidación en presencia de peróxido. Éste y otros radicales libres son liberados o generados durante el proceso de escisión, limpieza, desinfección y cultivo del explante (George, 1996; Uddin y Titov, 2007). La presencia de algunas sustancias fenólicas dañinas puede tener un efecto autocatalítico en su síntesis.

El daño que resulta de la producción de exudados es usualmente más severo durante los estados iniciales de cultivo. El problema tiende a cesar cuando el explante inicia su crecimiento. Por ejemplo, el cultivo de brotes y yemas de *Alnus oregona* produjo liberación y oxidación de sustancias durante las 10 primeras semanas en cultivo, provocando pérdidas importantes. Luego de la semana 22, cuando los explantes iniciaron su multiplicación, el

problema desapareció (Garton y Moses, 1986). Un fenómeno semejante se observó en *Gossypium hirsutum* L. (Ozyigit *et al.*, 2007).

Aparte del oscurecimiento de explantes, al estrés oxidativo se le ha relacionado con el desencadenamiento de otros desordenes fisiológicos, morfológicos, epigenéticos y genéticos que ocurren en los explantes cultivados, tales como recalcitrancia, hiperhidricidad, variación somaclonal y habituación (Cassells y Curry, 2001; Van Staden *et al.*, 2006).

Asimismo, el establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, especialmente leñosas, está en gran medida limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. Esto constituye uno de los problemas más serios y frecuentes, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* (George, 1996; Laukkanen *et al.*, 2000; Murkute y Shanti-Patil, 2003; Tang y Newton, 2004).

6.2 Inducción a callos mediante reguladores de crecimiento

Ningún tratamiento del diseño de superficie-respuesta aplicado para la inducción a callos en yemas axilares de *Jacquinia macrocarpa* dio alguna respuesta. En la figura 7 se muestran algunos tratamientos del diseño de superficie-respuesta, de igual manera es posible observar un daño en la superficie del explante de *Jacquinia macrocarpa* debido al método de desinfección tan drástico.



Figura 7. Daño provocado por el método de desinfección en yemas axilares de *Jacquinia macrocarpa*.

Así mismo, ningún tratamiento del diseño de superficie-respuesta aplicado para la inducción a callos en hojas de *Jacquinia macrocarpa* dio alguna respuesta. Sin embargo, en la figura 8 se observa que existe un efecto significativo con relación al tipo de incubación al que fue sometido el explante, dicho efecto es la necrosis del explante seleccionado para la inducción a callos mediante reguladores de crecimiento.

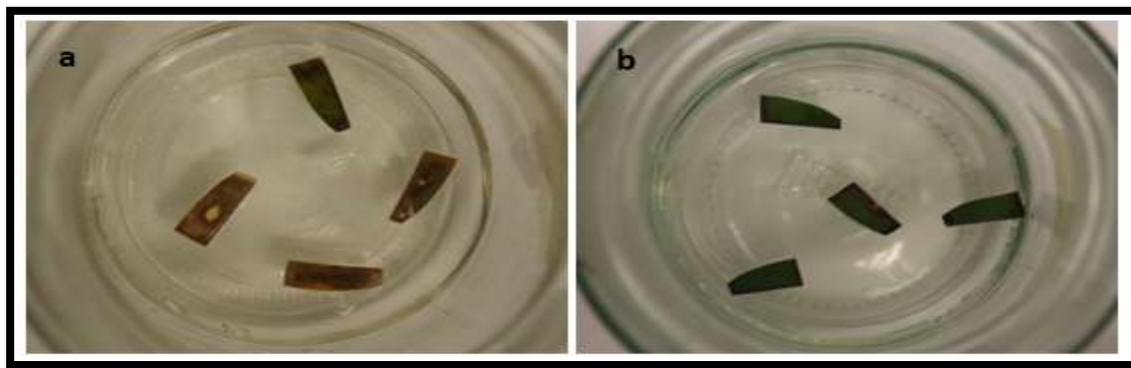


Figura 8. Efecto de la luz durante el periodo de incubación de los explantes a partir de las hojas de *Jacquinia macrocarpa* después de 30 días. Figura 4a. Fotoperiodo de 16 horas luz y Figura 4b. Sin fotoperiodo.

También en el cuadro 8 se observa una comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (HSD) de Tukey.

Cuadro 8. Efecto de la luz durante el periodo de incubación (A: Fotoperiodo de 16 horas luz y B: Sin fotoperiodo) de los explantes a partir de las hojas de *Jacquinia macrocarpa* después de 30 días, n=18 repeticiones por cada tratamiento.

Tratamiento	Necrosis en hojas de <i>Jacquinia macrocarpa</i> *
A	0.9375± 0.250 a
B	0.1111± 0.323 b
DMS (0.05)	0.2038

- Para evaluar si existen diferencias entre los tratamiento se asignó el valor de 1.00 (cuando hay un efecto desfavorable) y 0.00 (cuando hay efecto favorable).
- Letras iguales en una misma columna significan que no existen diferencia estadística significativa entre los tratamientos.
- (*) Después de un mes.
- DMS= Diferencia mínima significativa.

La figura 9 muestra el diagrama de Tukey que muestra esquemáticamente la presencia de necrosis en los explantes de hojas de *Jacquinia macrocarpa* ocasionada por el efecto de la luz durante el periodo de incubación. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

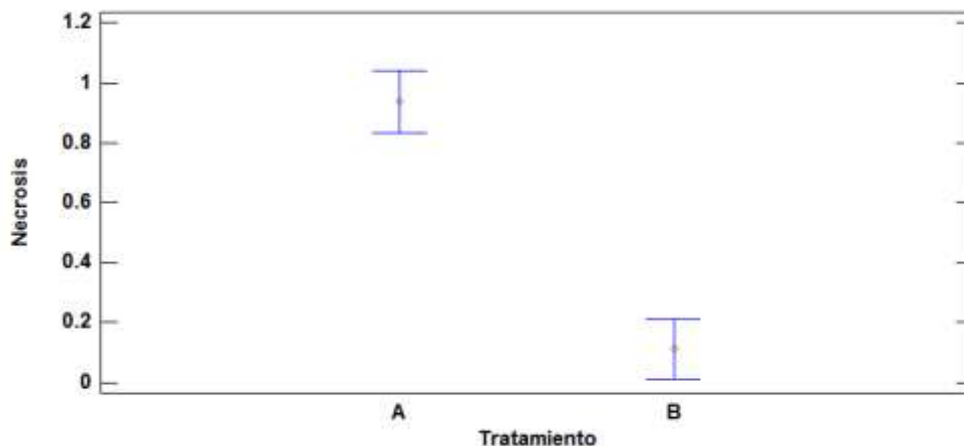


Figura 9. Efecto de la luz sobre la necrosis de los explantes de hojas de *Jacquinia macrocarpa* durante el periodo de incubación.

De acuerdo al análisis de varianza simple con un nivel del 95 % de confianza, existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto condiciones de incubación de los explantes a partir de hojas de *Jacquinia macrocarpa* para evitar la oxidación, que posteriormente provocará la necrosis de los explantes. Es decir, incubar los explantes de hojas de *Jacquinia macrocarpa* en oscuridad evita significativamente la necrosis de los mismos, en contraparte a la incubación de los explantes a un fotoperiodo de 16 horas de luz. La oxidaciones de explantes, en varias especies vegetales, disminuye o se evita si éstos, luego de su establecimiento in vitro, son puestos a crecer en una condición de oscuridad por algunas semanas. Posteriormente, los explantes se transfieren a un ambiente con luz normal, o en ciertas ocasiones, a una condición de baja luminosidad ($7-15 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) para ayudar a prevenir la oxidación (George, 1996). En relación con esto, Villalobos y Arias (1987) con caña de azúcar, Seneviratne y Wijesekara (1996) con *Hevea brasiliensis*, así como Sudripta *et al.* (1996) y Jha y Das (2004) en *Anacardium occidentale*, implementaron el crecimiento de explantes en oscuridad durante la primera semana de cultivo para prevenir los problemas de oxidación. Además, Kvaalen y Appelgren (1999) reportan diferencias significativas en la oxidación de explantes (embriones somáticos de *Picea abies*) según la fuente de luz (intensidad, tipo de luz, marca comercial de la fuente) que se utiliza en las cámaras de crecimiento. No obstante, la oscuridad o los bajos niveles de luz no siempre pueden reducir la oxidación. Este es el caso de *Eucalyptus tereticornis* (Das y Mitra, 1990) y *Hamamelis sp.* Y *Garrya elliptica* (Marks y Simpson, 1990), en donde la oxidación de fenoles en los explantes no disminuyó a pesar que los mismos fueron puestos a crecer en oscuridad desde el inicio.

Algunas investigaciones enfatizan la importancia de aplicar tratamientos al material donante, así como, considerar su origen, a modo de controlar la oxidación. En este sentido, George (1996) indica que la oxidación del explante puede ser evitada o reducida si este se toma de plantas donadoras etioladas, sea, que han crecido en oscuridad total, con intensidad de luz baja o incluso en días cortos. Al respecto, Zavaleta-Mancera *et al.* (2007) mencionan que en

días con alta irradiación, la cantidad de energía lumínica recibida en el cloroplasto es mayor a la requerida para la fijación del CO₂ durante la fotosíntesis, los excesos de energía son entonces captados por aceptores de electrones alternos, estimulando la formación de ROS. Además, Kefeli *et al.* (2003) indican que la luz incrementa la biosíntesis de sustancias fenólicas en el cloroplasto, el cual constituye su principal sitio de síntesis. Posteriormente los fenoles son acumulados en la vacuola en cantidades relativamente altas o depositados como lignina en las paredes celulares. Asimismo, Marks y Simpson (1990) demostraron que el mecanismo de oxidación fenólica y la inhibición del crecimiento en plantas leñosas pueden ser controlados por el nivel de irradiación recibido por la planta donante. Estos autores basaron su estudio en el metabolismo de fenoles, ya que la actividad de muchos sistemas enzimáticos, que participan en la síntesis y oxidación de los mismos, es inducida por la luz. En su investigación, con arbustos ornamentales, redujeron considerablemente la oxidación de los explantes cuando estos fueron tomados de plantas que crecieron en oscuridad total (*Hamamelis sp.*) o bajo cubierta plástica (*Garrya elliptica*), que permitía el paso de apenas un 1% de la luz del día. No obstante, *Quercus robur* para este beneficio fue relativo, ya que los efectos detrimentales de la liberación de polifenoles aparecieron a los 56 días en el 70% del material expuesto a la luz. En relación con lo anterior, Watad *et al.* (1992) mencionan que para evitar la oxidación y muerte de explantes de *Protea obtusifolia*, fue muy útil cubrir previamente con bolsas de papel los brotes de la planta donadora. También, en *Psidium guajava* (Pirela, 1996; León *et al.*, 1997) la supervivencia de los explantes estuvo afectada por la exposición de las plantas donantes a la irradiación solar. Se observó mayor supervivencia en los explantes tomados de plantas tratadas en oscuridad o con baja intensidad de luz. Además, indican que la protección solar de la planta donadora resultó en una reducción del contenido de fenoles preexistentes en los explantes. Por lo anterior, consideran la relación entre el contenido de compuestos fenólicos preexistentes en los meristemos apicales y la supervivencia de los mismos durante su cultivo *in vitro*.

6.3 Germinación de semillas inmaduras de *Jacquinia macrocarpa*

En el cuadro 9 se muestra los porcentajes de germinación de semillas inmaduras de *Jacquinia macrocarpa*, al término de 4 semanas se observó que el porcentaje de germinación de las semillas inmaduras en *Jacquinia macrocarpa* corresponde al 26 %.

Cuadro 9. Porcentaje de germinación de semillas inmaduras de *Jacquinia macrocarpa* durante un lapso de tiempo de 4 semanas, cada repetición contaba con 4 semillas inmaduras.

Repetición	Porcentaje de germinación (1 semana)	Porcentaje de germinación (2 semana)	Porcentaje de germinación (3 semana)	Porcentaje de germinación (4 semana)
1	40.00 %	40.00 %	40.00 %	40.00 %
2	20.00 %	60.00 %	60.00 %	60.00 %
3	00.00 %	00.00 %	00.00 %	00.00 %
4	20.00 %	20.00 %	20.00 %	20.00 %
5	00.00 %	00.00 %	00.00 %	00.00 %
6	40.00 %	60.00 %	60.00 %	60.00 %
7	20.00 %	20.00 %	20.00 %	20.00 %
8	00.00 %	00.00 %	00.00 %	00.00 %
9	20.00 %	40.00 %	40.00 %	40.00 %
10	20.00 %	20.00 %	20.00 %	20.00 %
Promedio	18.00 %	26.00 %	26.00 %	26.00 %

En la figura 10 se observan plántulas obtenidas a través de la germinación de semillas inmaduras de *Jacquinia macrocarpa* durante un lapso de tiempo de 4 semanas, la altura promedio de cada plántula 3.9 cm.

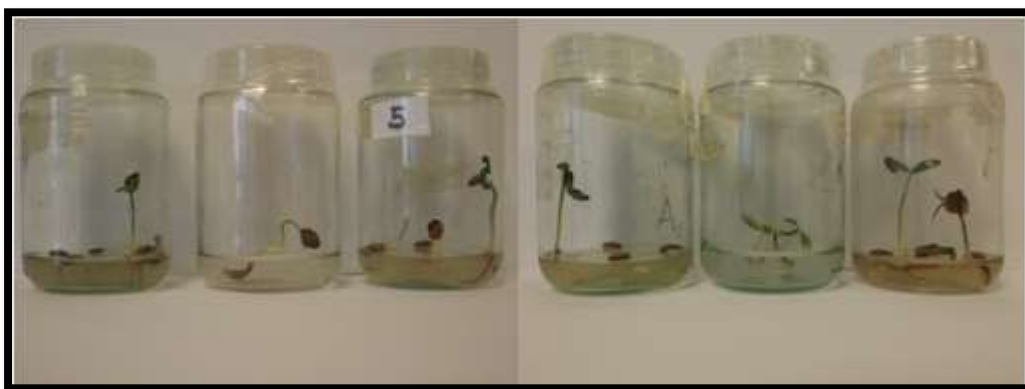


Figura 10. Plántulas de *Jacquinia macrocarpa* a través de la germinación de semillas inmaduras en un lapso de tiempo de 4 semanas.

6.4 Cuantificación de metabolitos secundarios en extractos acuosos y metanólicos de las raíces de *Jacquinia macrocarpa*

6.4.1 Cuantificación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales presentes en el extracto acuoso y metanólico de *Jacquinia macrocarpa* fue medido usando el método de Singleton *et al.*, 1999 a partir de una curva de calibración con ácido gálico ($r^2=0.998$), los resultados se muestran en la tabla 1. Como se muestra en la tabla 1, el contenido de fenoles totales promedio para el extracto acuoso de *Jacquinia macrocarpa* es de 0.7961 mg equivalentes de ácido gálico/ g de peso en seco,

mientras que el contenido de fenoles totales promedio para el extracto metanólico de *Jacquinia macrocarpa* es de 1.7157 mg equivalentes de ácido gálico/ g de peso en seco.

Tabla 1. Cuantificación de fenoles totales en el extracto acuoso y metanólico de *Jacquinia macrocarpa*.

	Concentración de fenoles totales en el extracto acuoso de <i>Jacquinia macrocarpa</i> (mg de ácido gálico/ g de peso en seco)	Concentración de fenoles totales en el extracto metanólico de <i>Jacquinia macrocarpa</i> (mg de ácido gálico/ g de peso en seco)
Repetición 1	0.9872	1.5816
Repetición 2	1.0044	1.8689
Repetición 3	0.9967	1.6966
Promedio	0.7961	1.7157

6.4.2 Cuantificación de flavonoides

El contenido de flavonoides presentes en el extracto acuoso y metanólico de *Jacquinia macrocarpa* fue medido usando el método de Chang *et al.*, 2002 a partir de una curva de calibración con quercetina ($r^2=0.9976$), los resultados se muestran en la tabla 2. Como se muestra en la tabla 2, el contenido de flavonoides promedio para para el extracto acuoso de *Jacquinia macrocarpa* es de 0.3677 mg equivalentes de quercetina/ g de peso en seco, mientras que el contenido de flavonoides promedio para el extracto metanólico de *Jacquinia macrocarpa* es de 0.1822 mg equivalentes de quercetina/ g de peso en seco.

Tabla 2. Cuantificación de flavonoides en el extracto acuoso y metanólico de *Jacquinia macrocarpa*.

	Concentración de flavonoides en el extracto acuoso de <i>Jacquinia macrocarpa</i> (mg de quercetina/ g de peso en seco)	Concentración de flavonoides en el extracto metanólico de <i>Jacquinia macrocarpa</i> (mg de quercetina/ g de peso en seco)
Repetición 1	0.3722	0.1835
Repetición 2	0.3622	0.1810
Repetición 3	0.3689	0.1823
Promedio	0.3677	0.1822

6.4.3 Cuantificación de taninos

El contenido de taninos presentes en el extracto acuoso y metanólico de *Jacquinia macrocarpa* fue medido usando el método de Sherman & Kowalska, 2008 a partir de una curva de calibración con catequina ($r^2=0.999$), los resultados se muestran en la tabla 3. Como

se muestra en la tabla 3, el contenido de taninos promedio para el extracto acuoso de *Jacquinia macrocarpa* es de 0.4706 mg equivalentes de catequina/ g de peso en seco, mientras que el contenido de taninos promedio para el extracto metanólico de *Jacquinia macrocarpa* es de 1.2639 mg de equivalentes catequina/ g de peso en seco.

Tabla 3. Cuantificación de taninos en el extracto acuoso y metanólico de *Jacquinia macrocarpa*.

	Concentración de taninos en el extracto acuoso de <i>Jacquinia macrocarpa</i> (mg de catequina/ g de peso en seco)	Concentración de taninos en en el extracto metanólico de <i>Jacquinia macrocarpa</i> (mg de catequina/ g de peso en seco)
Repetición 1	0.4544	1.2705
Repetición 2	0.4781	1.2566
Repetición 3	0.4794	1.2646
Promedio	0.4706	1.2639

Siguiendo un criterio biosintético, los productos naturales secundarios podrían dividirse en tres grandes grupos de compuestos: nitrogenados, terpénicos y fenólicos. Los primeros, entre los que se encuentran los alcaloides, se derivan principalmente de los aminoácidos. Los terpenos por su parte, se obtienen a través de la ruta del mevalonato, mientras que los fenoles se derivan a partir de la ruta del ácido shikímico o de la ruta del malonato (De Troiani, 2005).

Los compuestos fenólicos y los flavonoides se han generalizado en el reino vegetal. Estos compuestos actúan como antioxidantes y captadores de radicales libres. Baba y Malik (2014) encontró que el contenido total de fenoles en los extractos metanólicos de raíces de *Arisaema jacquemontii* Blume es de 45.17 ± 1.70 equivalentes de ácido gálico/g. Así mismo, el contenido total de flavonoides encontrado es de 35 ± 2.20 equivalentes de rutina/g. Por otro lado, Sengar *et al.* (2015) mostró la presencia de saponinas, flavonoides, fenoles, taninos, esteroides y carbohidratos en el análisis preliminar fitoquímico del extracto etanólico de raíces de *Jasminum sambac* (EJS). El contenido total de saponinas en el material vegetal encontrado fue de 126.82 mg equivalentes de diosgenina/g, mientras que el contenido total de carbohidratos presentes en EJS es de 108.42 mg equivalentes de D-fructosa/g. Además el contenido total de fenoles en EJS estimado es de 28.61 mg equivalentes de ácido gálico/g, mientras que el contenido total de taninos es de 15.90 mg equivalentes de ácido tánico/g. Igualmente, el contenido total de flavonoides en EJS encontrado es de 43.06 mg equivalentes de rutina/g. Otras investigaciones entorno al análisis de metabolitos secundarios presentes en extractos de raíces de plantas es el realizado por Chang *et al.*, 2014. Chang *et al.* (2014) indicó que el contenido de fenoles totales en el extracto etanólico de raíces de lotus (*Nelumbo Nucifera*) es de 195.4 ± 10.3 mg equivalentes de ácido gálico/g. Asimismo, el contenido total de flavonoides es de 9.4 ± 0.9 mg equivalentes de rutina/g.

Al comparar los metabolitos secundarios cuantificados en los extractos acuosos y metanólicos de las raíces de *Jacquinia macrocarpa* con relación a las investigaciones anteriormente mencionadas en otras especies vegetales se denota una variación significativa entorno a la presencia de éstos en las raíces de *Jacquinia macrocarpa*. Existe una gran variación cualitativa y cuantitativa en el contenido de metabolitos secundarios entre diferentes especies vegetales. El contenido de estas sustancias puede alcanzar hasta un 40% de la materia seca dependiendo de factores climáticos, edafológicos y de la parte de la planta en que se encuentren. Kumar (1992) encontró que los distintos compuestos que puede producir una especie presentan una determinada distribución dentro de los órganos, tejidos y células de una planta, y ello responde frecuentemente a las influencias ambientales.

Por ejemplo, los factores que afectan el contenido de taninos en los árboles son: genética de la planta, especie, grado de madurez, estación climática, humedad, estado de crecimiento, luminosidad, corte y defoliación por herbívoros (Norton & Ahn, 1997). También se ha encontrado que la planta produce y acumula diferentes cantidades de metabolitos en cada una de sus partes (Oncina *et al.*, 2000), y que la temperatura también afecta la producción de metabolitos secundarios, aunque no se conocen con claridad los mecanismos bioquímicos por los que esto ocurre. Se ha propuesto también que el estrés térmico estimula la producción (Georgiev *et al.*, 2004), generando cambios en los procesos de transducción de señales al interior de la célula que activan tanto la transcripción de genes, como enzimas específicas involucradas en la síntesis de estos metabolitos. Además, el fotoperíodo, la relación luz/oscuridad y la duración del período, pueden afectar el crecimiento, producción y acumulación interna de metabolitos secundarios como se ha encontrado en cultivos de *C. arabica* (Zhang *et al.*, 2002) y *Podophyllum hexandrum* (Chattopadhyay *et al.*, 2002). Otro factor ambiental de alta incidencia en la concentración de taninos es la fertilidad del suelo. Barry y Forss (1983) encontraron una concentración de taninos condensados (TC) de 8 al 11% en *Lotus pedunculatus* creciendo en suelos ácidos sin aplicación de fertilizantes, mientras que los valores eran tan solo de 2 al 3% en suelos fertilizados. La baja disponibilidad de agua también contribuye a la producción de TC, debido a que, en tales circunstancias las plantas cierran sus estomas y restringen el proceso de fotosíntesis.

7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Durante el desarrollo de esta investigación se logró determinar los métodos de desinfección de diversos explantes (hojas, yemas axilares y semillas inmaduras) para la especie *Jacquinia macrocarpa*. Esto permitió el desarrollo de otros estudios de cultivo *in vitro* entorno a la especie. El principal problema derivado de la implementación de los métodos de desinfección fue la oxidación de los explantes evaluados, lo que ocasionaba en ocasiones necrosis en el explante.

De igual manera, ningún tratamiento del diseño de superficie-respuesta con reguladores de crecimiento vegetal (2,4-D y ANA) aplicado para la inducción a callos en yemas axilares y

hojas de *Jacquinia macrocarpa* dio alguna respuesta. Para poder contar con material vegetal adecuado para las investigaciones, se recomienda utilizar como explante plántulas provenientes de semillas germinadas en condiciones asépticas, ya que diversos factores como la edad influyen en el establecimiento de técnicas de cultivo *in vitro*, sobre todo en especies con características leñosas.

Los metabolitos secundarios analizados en los extractos acuosos y metanólicos de las raíces de *Jacquinia macrocarpa* fueron fenoles totales, flavonoides y taninos. El contenido de fenoles totales promedio para el extracto acuoso de *Jacquinia macrocarpa* es de 0.7961 mg equivalentes de ácido gálico/ g de peso en seco, mientras que el contenido de fenoles totales promedio para el extracto metanólico de *Jacquinia macrocarpa* es de 1.7157 mg equivalentes de ácido gálico/ g de peso en seco. Por otro lado, el contenido de flavonoides promedio para el extracto acuoso de *Jacquinia macrocarpa* es de 0.3677 mg equivalentes de quercetina/ g de peso en seco, mientras que el contenido de flavonoides promedio para el extracto metanólico de *Jacquinia macrocarpa* es de 0.1822 mg equivalentes de quercetina/ g de peso en seco. Mientras que, el contenido de taninos promedio para el extracto acuoso de *Jacquinia macrocarpa* es de 0.4706 mg equivalentes de catequina/ g de peso en seco, mientras que el contenido de taninos promedio para el extracto metanólico de *Jacquinia macrocarpa* es de 1.2639 mg de equivalentes catequina/ g de peso en seco. Dichas concentraciones son menores a las comparadas con otras especies vegetales (Baba y Malik 2014; Chang *et al.*, 2014; Sengar *et al.* 2015). Esto puede estar asociado a la genética de la planta, especie, grado de madurez, estación climática, humedad, estado de crecimiento, luminosidad, corte y defoliación por herbívoros. Por lo que se recomienda cuantificar los metabolitos secundarios presentes en las raíces de *Jacquinia macrocarpa* en una diferente región del Estado de Chiapas o estación climática a la que se analizó en esta investigación.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES

Abdelwahd, R.; Hakam, N.; Labhilili, M.; Udupa, S. (2008). Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of fababean. *African Journal of Biotechnology*. 7: 997-1002.

Amiot, M.; Forget, F.; Goupy, P. (1996). Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. *Herba-Polonica*. 42: 237-247.

Anzola, J.M.; Sieberer, T.; Ortbauer, M.; Butt, H.; Korbei, B.; Weinhofer, I.; Müllner, A.E.; Luschnig, C. (2010). Putative *Arabidopsis* transcriptional adaptor protein (PROPORZI) is required to modulate histone acetylation in response to auxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 10308–10313.

Apel, K.; Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55: 373-399.

Arauz, F. (1998). Fitopatología; un enfoque agroecológico. San José Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 467 p.

Azofeifa, A. (2007). Desarrollo de metodologías para la caracterización de materiales promisorios de jocote (*Spondias purpurea* L.) por medio demarcadores moleculares, para el rescate de embriones y para el cultivo de yemas *in vitro*. Tesis Mag. Sc., Sistema de Estudios de Posgrado, Universidad de Costa Rica. 134 p.

Baba, S.; Malik, S. A. (2014). Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of root extract of *Aeisaema jacquemontii* Blume. Journal of Taibah University for Science. Available online 4 December 2014.

Banno, H.; Ikeda, Y.; Niu, Q.W.; Chua, N.H. (2001). Overexpression of *Arabidopsis* ESR1 induces initiation of shoot regeneration. Plant Cell 13: 2609–2618.

Barry, T. N.; Forss, D. A. (1983). The condensed tannin content of vegetative *Lotus pedunculatus* its regulation by fertilizer application and effect upon protein solubility. Journal of the Science of Food and Agriculture 34: 1047-1056

Bhat, S.; Chandel, K. (1991). A novel technique to over-come browning in tissue culture. Plant Cell Reports. 10:358-361.

Bingham, E. T.; Hurley, L. V.; Kaatz, D. M.; Saunders, J. W. (1975). Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. Crop Sci. 15:719-721.

Biondi, S.; Thorpe, T. A. (1981). Requirements for a tissue culture facility. Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 1-20.

Bonga, J. M. (1980). Plant propagation through tissue culture, emphasizing woody species. Plant cell cultures: Results and perspectives. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, Holanda. p. 253-264.

Boutilier, K.; Offringa, R.; Sharma, V.K.; Kieft, H.; Ouellet, T.; Zhang, L.; Hattori, J.; Liu, C.-M.; van Lammeren, A.A.M.; Miki, B.L.A.; Custers, J.B.M.; van Lookeren Campagne, M.M. (2002). Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. Plant Cell 14: 1737–1749.

Bouyer, D.; Roudier, F.; Heese, M.; Andersen, E.D.; Gey, D.; Nowack, M.K.; Goodrich, J.; Renou, J. P.; Grini, P.E.; Colot, V.; Schnittger, A. (2011). Polycomb repressive complex 2 controls the embryo-to-seedling phase transition. PLoS Genet. 7: e1002014.

Bovo, O. A.; Quarín, C. L. (1983). Obtención de plantas de *Paspalum alnum* (*Gramineae*) a partir del cultivo *in vitro* de ovarios jóvenes. Phytion 43:29-34.

Boxus, P. H.; Quoirin, M.; Laine, J. M. (1977). Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Springer-Verlag, Berlín, Alemania. p. 130-143.

Bratzel, F.; López-Torrejón, G.; Koch, M.; Del Pozo, J.C.; Calonje, M. (2010). Keeping cell identity in *Arabidopsis* requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination. *Curr. Biol.* 20: 1853–1859.

Bray, E.; Bailey-Serres, J.; Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. eds. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. 49:1158-1203.

Cassells, A.; Curry, R. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 64: 145-157.

Chang, K. J.; Kim, S. H.; Kim, K. S.; Lee, Y. J.; You, J. S. (2014). Ethanol extract of lotus (*Nelumbo nucifera*) root exhibits an anti-adipogenic effect in human pre-adipocytes and anti-obesity and anti-oxidant effects in rats fed a high-fat diet. *Nutrition Research* 34: 258-267.

Chanvivattana, Y.; Bishopp, A.; Schubert, D.; Stock, C.; Moon, Y.-H.; Sung, Z.R.; Goodrich, J. (2004). Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development* 131: 5263–5276.

Chu, C. C.; Wang, C. C.; Sun, C. S.; Hsu, C.; Yin, K. C.; Chu, C. Y. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18:659:668.

Clapham, D. H. (1977). Haploid induction in cereals. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Springer-Verlag, Berlín, Alemania. p. 279-298.

Cockcroft, C. E.; den Boer, B. G.; Healy, J. M.; Murray, J. A. (2000). Cyclin D control of growth rate in plants. *Nature* 405:575-579.

Das, T.; Mitra, G. (1990). Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 22: 95-103.

Davies, P. J. (1995). The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: Davies, P. J. (Ed). *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 1-11.

Debergh, P. (1982). Physical properties of culture media. *Plant tissue culture 1982.* Jap. Assoc. Plant Tissue Culture, Tokio. p. 135-136.

De Troiani, P.M. (2005). Metabolitos secundarios, Alcaloides, Universidad Nacional de la Pampa.

Dewitte, W.; Riou.Khamlichi, C.; Scofield, S.; Healy, J. M.; Jacquard, A.; Kilby, N. J.; Murray, J. A. (2003). Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* 15:79-92.

Dodds, J. H.; Roberts, L. W. (1982). Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, Cambridge. 178 p.

Dodds, J. H. (1983). Tissue culture of hardwoods. Tissue culture of trees. AVI Publishing. Co. Westport, Connecticut, E. U. p. 22-28.

Dougall, D. K. (1980). Nutrition and metabolism. Plant tissue culture as a source of biochemical. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E. U. p. 21-58.

Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Flick, C. E. (1981). Growth and behavior of cell culture: Embryogenesis and organogenesis. Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, New York. p. 45-113.

Fan, M.; Xu, C.; Xu, K.; Hu, Y. (2012). LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration. *Cell Res.* 22: 1169-1180.

Frank, M.; Guivarc'h, A.; Krupková, E.; Lorenz-Meyer, I.; Chriqui, D.; Schmülling, T. (2002). Tumorous shoot development (TSD) genes are required for co-ordinated plant shoot development. *Plant J.* 29: 73–85.

Frankenberger, E. A.; Hasegawa, P. M.; Tigchelaar, E. C. (1981). Influence of environment and developmental state on the shoot-forming capacity of tomato genotypes. *Z. Pflanzenphysiol.* 102:221-232.

Frankenberger, E. A.; Hasegawa, P. M.; Tigchelaar, E. C. (1981). Diallel analysis of shoot-forming capacity among selected tomato genotypes. *Z. Pflanzenphysiol.* 102:233-242.

Gamborg, O. L.; Miller, R. A.; Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.

Gamborg, O. L.; Murashige, T.; Thorpe, T. A.; Vasil, I. K. (1976). Plant tissue culture media. *In vitro* 12:473-478.

Gamborg, O. L.; Shyluk, J. P. (1981). Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures. Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 21-44.

- Garton, S.; Moses, M. (1986). Production of native plants in tissue culture. Combined Proceeding International Plant Propagator's Society. 35: 306-315.
- Gautheret, R. J. (1959). La culture des tissus végétaux: Techniques et réalisations. Masson, París. 863 p.
- George, E. (1993). Plant propagation by tissue culture; part 1. The technology. 2 ed. Exegetics Limited. England. 574 p.
- George, E. (1996). Plant propagation by tissue culture; part 2. In Practice. 2 ed. Exegetics Limited. England. 1361 p.
- Georgiev, M.; Pavlov, A.; Ilieva, M. (2004). Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspensions: the effect of temperature. Biotechnology Letters 26: 855-856
- González, J. L. & Toledo, J. E. (2013). Mortalidad de garrapatas tratadas con diferentes extractos acuosos de plantas endémicas del estado de Chiapas.
- Goren, R.; Altman, A.; Giladi, I. (1979). Role of ethylene in abscisic acid-induced callus formation in citrus bud cultures. Plant Physiol 63:280-282.
- Gratão, P. L.; Polle, A.; Lea, P. J.; Azevedo, R. A. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Functional Plant Biology. 32: 481-494.
- Harms, C.; Baktir, I.; Oertli, J. (1983). Clonal propagation *in vitro* of red beet (*Beta vulgaris* spp.) by multiple adventitious shoot formation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2: 93-102 p.
- Hu, C. Y.; Wang, P. J. (1983). Meristem, shoot tip, and bud cultures. Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing. Nueva York. v. 1, p. 177-227.
- Hu, Y.; Bao, F.; Li, J. (2000). Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. Plant J. 24:693-701.
- Hughes, K. W. (1981). *In vitro* ecology; exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. Env. Exp. Bot. 21:281-288.
- Ikeda, Y., Banno, H., Niu, Q.W., Howell, S.H., and Chua, N.H. (2006). The ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2 gene in *Arabidopsis* regulates CUP-SHAPED COTYLEDON 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development. Plant Cell Physiol. 47: 1443–1456.
- Iwase, A.; Mitsuda, N.; Koyama, T.; Hiratsu, K.; Kojima, M.; Arai, T.; Inoue, Y.; Seki, M.; Sakakibara, H.; Sugimoto, K.; Ohme-Takagi, M. (2011a). The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. Curr. Biol. 21: 508–514.

Iwase, A.; Ohme-Takagi, M.; Sugimoto, K. (2011b). WIND1: A key molecular switch for plant cell dedifferentiation. *Plant Signal. Behav.* 6: 1943–1945.

Jha, S.; Das, S. (2004). Tissue culture of cashewnut. *In: Plant biotechnology and molecular markers*. Scrivastava, P; Narula, A; Srivastava, S. Anamaya, Publishers, New Delhi, India. p. 244-260.

Jensen, C. J. (1977). Monoploid production by chromosome elimination. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Springer-Verlag, Berlín. p. 299-330.

Jones, O. P.; Hoggood, M. E.; O'Farrell, D. (1977). Propagation *in vitro* of M. 26 apple rootstocks. *J. Hort. Sci.* 52:235-238.

Kao, K. N.; Michayluk, M. R. (1980). Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. *Z. Pflanzenphysiol.* 96:135-141.

Kao, K. N.; Michayluk, M. R. (1981). Embryoid formation in alfalfa cell suspension cultures from different plant. *In vitro* 17:645-648.

Karp, G. (1998). *Biología celular y molecular*. Traducido por Dr. J. Pérez. UNAM. McGraw-Hill Interamericana. México D.F. México. 746 p.

Kartha, K. K.; Gamborg, O. L.; Shyluk, J. P.; Constabel, F. (1976). Morphogenetic investigations on *in vitro* leaf culture of tomato (*Lycopersicon esculenium* Mill. cv. Starfire) and high frequency plant regeneration. *Z. Pflanzenphysiol.* 77:292-301.

Kartha, K. K.; Champoux, S.; Gamborg, O. L.; Pahl, K. (1977). *In vitro* propagation of tomato by shoot apical meristem culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102:346-349.

Kartha, K. K.; Mroginski, L. A.; Pahl, K.; Leung, N. L. (1981). Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems. *Plant Sci. Lett.* 22:301-307.

Kartha, K. K.; Mroginski, L. A.; Pahl, K.; Leung, N. L. (1981). Plant regeneration from meristems of grain legumes: Soybean, cowpea, peanut, chickpea, and bean. *Can. J. Bot.* 59:1671-1679.

Kefeli, V.; Kalevitch, M.; Borsari, B. (2003). Phenolic cyclein plants and environment. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2: 13-18.

Krupková, E.; Immerzeel, P.; Pauly, M.; Schmülling, T. (2007). The TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT2 gene of *Arabidopsis* encoding a putative methyltransferase is required for cell adhesion and co-ordinated plant development. *Plant J.* 50: 735–750.

Krupková, E.; Schmölling, T. (2009). Developmental consequences of the tumorous shoot development1 mutation, a novel allele of the cellulose-synthesizing KORRIGAN1 gene. *Plant Mol. Biol.* 71: 641–655.

Kumar, R. (1992). Antinutritional factors. The potential risks of toxicity and the methods to alleviate them. En: Speedy, A.W. & P.L. Pugliese. 1992. Legumes trees and other fooder trees as protein source for livestock. FAO animal Production and Health Paper. No. 102. 145 pp.

Kvaalen, H.; Appelgren, M. (1999). Light quality influences germination, root growth and hypocotyl elongation in somatic embryos but not in seedlings of Norway spruce. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 35: 437-441.

Kőszegi, D.; Johnston, A.J.; Rutten, T.; Czihal, A.; Altschmied, L.; Kumlehn, J.; Wüst, S.E.J.; Kirioukhova, O.; Gheyselinck, J.; Grossniklaus, U.; Bäumlein, H. (2011). Members of the RKD transcription factor family induce an egg cell-like gene expression program. *Plant J.* 67: 280–291.

Laukkanen, H; Rautiainen, L; Taulavuori, E; Hohtola, A. (2000). Changes of cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiology.* 20: 467–475.

León, S; Arenas, L; Vilorio, Z. (1997). Efecto de la exposición solar de las plantas donantes en la iniciación del cultivo *in vitro* de guayabo (*Psidium guajava* L). *LUZ. Rev. Fac. Agron. Venezuela.* 14: 47-53.

Litz, R. E.; Conover, R. A. (1979). Development of systems for obtaining paraxial *Carica* hybrids. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 92:281-283.

Litz, R. E.; Conover, R. A. (1981). *In vitro* polyembryony in *Carica papaya* L. ovules. *Z. Pflanzenphysiol.* 104:285-288.

Lotan, T.; Ohto, M.; Yee, K.M.; West, M.A.; Lo, R.; Kwong, R.W.; Yamagishi, K.; Fischer, R.L.; Goldberg, R.B.; Harada, J.J. (1998). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93: 1195–1205.

Marks, T.; Simpson, E. (1990). Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stock plants to darkness or low levels of irradiance. *Journal of Horticultural Science* 65: 103-111.

Martin, S. M. (1980). Environmental factors; B: Temperature, aeration, and pH. *Plant tissue culture as a source of biochemical.* CRC Press, Boca Raton, Florida, E. U. p. 143-148.

- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7: 405-410.
- Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M.; Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*. 9: 490-498.
- Monnier, M. (1976). Culture *in vitro* de l'embryon immature de *Capsella bursapastoris* Moench. *Rev. Cyt. Biol. Végét.* 39:1-120.
- Mroginski, L. A. (1975). Plantas haploides de *Nicotiana spp.* obtenidas por cultivo *in vitro* de anteras. *Corrientes*, En: Memorias de la Segunda Reunión Nacional Técnica del Tabaco. *Corrientes*, Argentina. v.1, p. 97-111.
- Mroginski, L. A.; Fernández, A. (1979). Cultivo *in vitro* de anteras de especies de *Arachis* (Leguminosae). *Oléagineux* 34:243-248.
- Mroginski, L. A.; Fernández, A. (1981). Regeneration of pea (*Pisum sativum* L. cv. Century) plants by *in vitro* culture of immature leaves. *Can. J. Bot.* 59:826-830.
- Mroginski, L. A.; Fernández, A.; Shyluk, J. P. (1981). Regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plantlets by *in vitro* culture of immature leaves. *Can. J. Bot.* 59:826-830.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium growth and bioassays with tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Murkute, A.; Shanti-patil, M. (2003). Exudation and browning in tissue culture of pomegranate. *Agricultural Science Digest*. 23: 29-31.
- Norton, B. W.; Ahn, J. H. (1997). A comparison of fresh and dried *Calliandra calothyrsus* supplements for sheep given a basal diet of barley straw. *Journal of agriculture Science* 129: 485-494
- Nitsch, J. P. (1969). Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology* 19: 389-404.
- Ogita, S. (2005). Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. *Plant Biotechnology*. 22: 119-125.
- Oncina, R.; Botía, J. M.; Del Río, J. A.; Ortuño, A. (2000). Bioproduction of diosgenin in callus cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. *Food Chemistry* 70: 489-492
- Oono, K. (1981). *In vitro* methods applied to rice. Academic Press, Nueva York. p. 273-298.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2003). Resistencia a los antiparásitos: Estado actual con énfasis en América Latina. *Estudio FAO producción y sanidad animal* 157.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2007). Animal Production and Health Paper 36. Ticks and tick-borne diseases. Selected articles from the WORLD ANIMAL REVIEW: Disponible en: <http://www.fao.org/DOCREP/004/X6538E/X6538E00.HTM>.

Ozyigit, I.; Kahraman, M.; Ercan, O. (2007). Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). African Journal of Biotechnology. 6: 3-8.

Pennington, T.D., & Sarukhán, J. (2005). Árboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies. D.F., México: Fondo de Cultura Económica.

Pirela, E. (2002). Propagación clonal *in vitro* del guayabo (*Psidium guajava* L.) a partir de ápices caulinares, segmentos nodales y miniestacas detallo. Disponible en <http://pegasus.ucla.edu/ve/ccc/resumen/agronomia/ca2-04-ag.htm>. 2p.

Pittman, R. N.; Banks, D. J.; Kirby, J. S.; Mitchell, E. D.; Richardson, P. E. (1983). *In vitro* culture of immature peanut (*Arachis spp.*) leaves: Morphogenesis and plantlet regeneration. Peanut Sci. 10:21-25.

Pompeu, G.; Grato, P.; Vitorello, V.; Azevedo, R. (2008). Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. Scientia Agricola. 65: 548-552.

Reinert, J.; Yeoman, M. M. (1982). Plant cell and tissue culture: A laboratory manual. Springer-Verlag, Berlín. 83 p.

Rey, H. Y.; Mroginski, L. A. (1978). Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Phytion 36:171-176.

Rey, H. Y.; Mroginski, L. A.; Fernández, A. (1980). Inducción de callos y raíces en explantos de seis cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Phytion 39:161-170.

Riou-Khamlichi, C.; Huntley, R.; Jacqumard, A.; Murray, J. A. (1999). Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. Science 283:1541-1544.

Rubluo, A.; Mroginski, L. A.; Kartha, K. (1982). Morphogenetic responses of pea leaflets cultured *in vitro*. Jap. Assoc. Plant Tissue Culture, Tokio. p. 151-152.

Rodríguez-Vivas, R.I., Quiñones, A.F., Fragoso, S.H. (2005). Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. En: Enfermedades de importancia económica en producción animal. Rodríguez-Vivas, R.I. editor. México, D.F. Mc Graw-Hill-UADY, pp. 571-592.

Sakai, H.; Honma, T.; Aoyama, T.; Sato, S.; Kato, T.; Tabata, S.; Oka, A. (2001). ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. Science 294: 1519–1521.

Seabrook, J. E. A. (1980). Laboratory culture. Plant tissue culture as a source of biochemical. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 1-20.

Seibert, M.; Kadkade, P. G. (1980). Environmental factors; A; Light. Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 123-141.

Seneviratne, P.; Wijesekara, G. (1996). The problem of phenolic exudates in *in vitro* culture of mature *Hevea brasiliensis*. Journal of Plantation Crop 24: 54-62.

Sengar, N.; Joshi, A.; Prasad, S. K.; Hemalatha, S. (2014). Anti-inflammatory, analgesic and anti-pyretic activities of standardized root extract of *Jasminum sambac*. Journal of Ethnopharmacology 160:140-148.

Singh, M.; Krikorian, A. D. (1981). White's standard nutrient solution. Ann. of Bot. 47:133-139.

Sondahl, M. R.; Spahlinger, D. A.; Sharp, W. R. (1979). A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol. 94:101-108.

Steward, F. C. (1983). Reflections on aseptic culture. Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing, Nueva York. v. 1, p. 1-10.

Stone, S.L.; Kwong, L.W.; Yee, K.M.; Pelletier, J.; Lepiniec, L.; Fischer, R.L.; Goldberg, R.B.; Harada, J.J. (2001). LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 11806–11811.

Street, H. E. (1977). Introduction. Plant tissue and cell culture. University of California Press, Berkeley, California, E.U. p. 1-10.

Street, H. E. (1977). Cell (suspension) cultures-techniques. Plant tissue and cell culture. University of California Press, Berkeley, California, E.U. p. 61-102.

Styer, D. J.; Chin, C. K. (1983). Meristem and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm preservation. Hort. Rev. 5:221-277.

Sudripta, D.; Timir, B.; Sumita, J. (1996). *In vitro* propagation of cashewnut. Plant Cell Reports 15: 615-619.

Sunderland, N. (1974). Anther culture as a means of haploid induction. Haploids in higher plants: Advances and potential. The University of Guelph, Guelph, Canadá. p. 91-122.

Stähl, B. (1987). The genus *Theophrasta* (Theophrastaceae): foliar structures, floral biology and taxonomy. Nord J Bot 7:529-538.

Stähl, B. (1989). A synopsis of Central American Theophrastaceae. Nord J Bot 9:15-30.

Stähl, B. (1990). Theophrastaceae. Pages 1-21 in G Harling, L Andersson, eds. Flora of Ecuador 39. Department of Systematic Botany, University of Göteborg, Göteborg.

Stähl, B. (1992). On the identity of *Jacquinia armillaris* (Theophrastaceae) and related species. *Brittonia* 44:54-60.

Stähl, B. (1993). *Votschia*, a new genus of Theophrastaceae from northeastern Panama. *Brittonia* 45:204-207.

Stähl, B. (1987). A synopsis of *Jacquinia* (Theophrastaceae) in the Antilles and South America. *Nord J Bot* 15:493-511.

Stähl, B., Axelrod F. S. (1998). *Jacquinia pauciflora* (Theophrastaceae), a new species from Puerto Rico. *Brittonia* 50:1-4.

Tabiyeh, D.; Bernard, F.; Shacker, H. (2006). Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *pistacia vera* shoot tips culture. *Acta Horticulturae*. 726: 201-204.

Tajima, Y.; Imamura, A.; Kiba, T.; Amano, Y.; Yamashino, T.; Mizuno, T. (2004). Comparative studies on the type-B response regulators revealing their distinctive properties in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 45: 28–39.

Tang, W.; Harris, L.; Outhavong, V.; Newton, R. (2004). Antioxidants enhance *in vitro* plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Cell Reports*. 22: 871-877.

Tang, W.; Newton, R. (2004). Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science*. 167: 621-628.

Thomas, E.; Davey, M. R. (1975). From single cells to plants. Wykeham Publ., Londres. 171 p.

Tsukagoshi, H.; Morikami, A.; Nakamura, K. (2007). Two B3 domain transcriptional repressors prevent sugar-inducible expression of seed maturation genes in *Arabidopsis* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 2543–2547.

Turrens, J. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*. 552: 335-344.

Uddin, S. N.; Titov, S. (2007). Somatic embryogenesis of *Musa* sp. cv. Kanthali using floral bud explants. *Journal of Plant Sciences*. 2: 35-44.

- Valderrama, R.; Corpas, F.; Carreras, A.; Fernández-Ocaña, A.; Chaki, M.; Luque, F.; Gómez-Rodríguez, M.; Colmenero-varea, P.; Del Río, L.; Barroso, J. (2007). Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters*. 581: 453-461.
- Van Staden, J.; Fennell, C.; Taylor, N. (2006). Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae*. 725: 55-62.
- Vatanpour-Azghandi, A.; Villiers, T.; Ghorbani, A.; Tajabadi, A. (2002). The microscopy of tissue decolouration and browning problem in pistachio callus cultures. *Acta Horticulturae*. 591: 377-388.
- Villalobos, I.; Arias, O. (1987). Inducción y multiplicación de callos *in vitro* en tres cultivares comerciales de caña de azúcar (*Saccharum* spp). *Agronomía costarricense*. 11: 39-44.
- Wetter, L. R.; Constabel, F. (1982). Plant tissue culture methods. National Research Council of Canada, Saskatoon, Canadá. 145 p.
- White, P. R. (1943). A handbook of plant tissue culture. The Ronald Press, Nueva York, 261 p.
- Xu, Z.; Sunderland, N. (1982). Inoculation density in the culture of barley anthers. *Scientia Sinica* 25:961-969.
- Yeoman, M. M.; MacLeod, A. J. (1977). Tissue (callus) culture-techniques. Plant tissue and cell culture. University of California Press, Berkeley, California, E.U. p. 31-59.
- Yeung, E. C.; Thorpe, T. A.; Jensen, C. J. (1981). In vitro fertilization and embryo culture. Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 253-271.
- Zavaleta-Mancera, H.; López-Delgado, H.; Loza-Tavera, H.; Mora-Herrera, M.; Trevilla-García, C.; Vargas-Suárez, M.; Ougham, H. (2007). Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *Journal of Plant Physiology* 164: 1572-1582.
- Zhang, W.; Curtin, C.; Kikuchi, M.; Franco, C. (2002). Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science* 162: 459-468.
- Zuo, J., Niu, Q.W., Frugis, G., and Chua, N.-H. (2002). The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in Arabidopsis. *Plant J*. 30: 349–359.