



# INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

## INGENIERÍA BIOQUÍMICA

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

RESIDENCIA PROFESIONAL

“MICROPROPAGACIÓN DE *JACQUINIA MACROCARPA*”

DR. FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ MICELI  
ASESOR

DR. CARLOS ALBERTO LECONA GUZMÁN  
CO-ASESOR

BRENDA IVONNE VÁZQUEZ RAMÍREZ  
ALUMNA

12270292  
No DE CONTROL

TUXTLA GUTIÉRREZ CHIAPAS JUNIO DEL 2016

# ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN.....	iii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. Cultivo de tejidos vegetales .....	2
2.2. Aplicaciones del cultivo de tejidos.....	3
2.3. Metabolitos secundarios .....	4
2.4 Rutas morfogénicas.....	6
2.4.1. Embriogénesis somática .....	7
2.4.2. Organogénesis .....	9
2.4.2.1 Organogénesis directa .....	9
2.4.2.2 Organogénesis indirecta.....	9
2.5. Reguladores de Crecimiento vegetal (RCV) .....	10
2.5.1. Auxinas .....	11
2.5.2. Giberelinas .....	12
2.5.3. Citocininas.....	13
2.6. Generalidades de <i>Jacquinia macrocarpa</i> .....	14
2.6.1. Trabajos realizados en la especie .....	15
2.6.2. Metabolitos secundarios de <i>Jacquinia macrocarpa</i> .....	15
2.7. Micropropagación .....	16
3. PROBLEMATICAS A RESOLVER .....	20

4. JUSTIFICACIÓN .....	21
5. OBJETIVOS.....	22
5.1. Objetivo general .....	22
5.2. Objetivos específicos.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
6.1. Material vegetal .....	23
6.2. Medio de cultivo MS .....	24
6.3. Preparación de medio MS .....	25
6.4. Desinfección de semillas .....	26
6.5. Germinación de semillas.....	28
6.6. Inducción de respuestas morfogénicas .....	29
6.7. Análisis estadístico de la germinación de semillas.....	31
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
7.1. Evaluación del Ácido Giberélico a diferentes concentraciones de GA <sub>3</sub> .....	32
7.2. Inducción de respuestas morfogénicas.....	34
8. CONCLUSIONES .....	40
9. COMPETENCIAS DESARROLLADAS .....	41
10. RECOMENDACIONES .....	42
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	43

## ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICAS

Cuadro 1. Composición de las Soluciones STOCK del medio MS.....	24
Cuadro 2. Cantidades de las soluciones Stock para medio MS.....	25
Cuadro 3. Fuente de nitrato y carbono del medio MS .....	26
Cuadro 4. Cantidad de Reguladores de crecimiento.....	26
Cuadro 5. Respuesta del efecto de <b>AIA</b> en explantes de <i>Bonellia macrocarpa</i> .....	34
Cuadro 6. Respuesta del efecto de <b>BAP</b> en explantes de <i>Bonellia macrocarpa</i> .....	36
Cuadro 7. Respuesta del efecto de <b>AIA</b> en explantes de <i>Bonellia macrocarpa</i> .....	38
Gráfica 1.....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general del cultivo de tejidos.....	4
Figura 2. Embriogénesis nuclear en hojas de Aranto.....	7
Figura 3. Embriogénesis cigótica y somática en zanahoria .....	8
Figura4.Estructura del ácido Giberelico.....	12
Figura 5. Estructura de algunas citocininas.....	13
Figura 6. Planta de <i>Jacquinia macrocarpa</i> .....	15
Figura 7. Semillas de <i>Jacquinia macrocarpa</i> .....	23
Figura 8. Desinfección de semillas de <i>Jacquinia macrocarpa</i> .....	2
Figura 9. Semillas de <i>Jacquinia macrocarpa</i> en medio MS.....	28
Figura 10.Inducción de respuestas morfogénicas de explantes de <i>Jacquinia macrocarpa</i> .....	30
Figura 11. Inducción de respuestas morfogénicas de explantes de <i>Jacquinia macrocarpa</i> Hojas e hipocótilos.....	31
Figura12. Germinación de semillas de <i>Jacquinia macrocarpa</i> .....	33
Fig.13 Efecto de AIA (ácido indol acético) en explantes de <i>Bonellia macrocarpa</i> .....	35
Fig.14. Efecto de BAP (6- bencil amino purina) en explantes de <i>Bonellia macrocarpa</i> .....	37
Fig.15 Efecto de 2,4-D (ácido. 2,4 diclorofenoxiacetico) en explantes de <i>Bonellia macrocarpa</i> .....	39

## RESUMEN

*Jacquinia macrocarpa* conocida comúnmente como Siqueté o profeta es una especie nativa del estado de Chiapas, se utiliza como cerca viva, sin embargo, los agricultores y ganaderos, al deforestar, han provocado que se encuentren cada vez menos ejemplares de esta especie. Fue utilizado por los mayas como medicina tradicional para tratar distintas afecciones de garganta y muelas. Las comunidades de Chiapas usan la corteza para matar pescados en los ríos y lagunas y los zoques lo utilizaron como arbolito de navidad. Estudios recientes han demostrado que en extractos metanólicos de esta especie, presentan compuestos con actividad anticancerígena lo que es de significativo valor farmacéutico.

El objetivo de este trabajo consistió en analizar el efecto del ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Jacquinia macrocarpa*, el efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal y distintos explantes sobre las respuestas morfogénicas con la finalidad de establecer un protocolo para micropropagar la especie. Para ello fue necesario utilizar semillas de *Jacquinia macrocarpa* las cuales fueron desinfectadas previamente y en condiciones de esterilidad fueron sembradas en medio MS adicionado con GA a 1.0, 2.0 y 4.0 mg.L<sup>-1</sup> y fueron evaluadas en un periodo de 45 días para conocer la respuesta germinativa. Posteriormente a los 75 días se obtuvieron plántulas con hipocótilos prominentes y hojas las cuales se usaron para evaluar el efecto de BAP (6-bencil amino purina), AIA (ácido-indol acético) y 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético). Los resultados obtenidos fueron: la concentración óptima para la germinación de semillas de la especie fue de 2.0 mg.L<sup>-1</sup> con un 54% de germinación con respecto a las otras concentraciones. En la inducción de respuestas morfogénicas en el tratamiento con AIA (ácido indol acético) fue la concentración de 2.0 mg.L<sup>-1</sup>, ya que en los explantes sembrados a esta concentración generaron mayor número de brotes vía organogénesis indirecta. El mejor tratamiento con BAP fue a la concentración de 2.0mg.L<sup>-1</sup> se formaron mayor número de brotes en ambos explantes. La concentración de 2.0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D es la más conveniente para obtener mayor masa de callo en ambos explantes.

## 1. INTRODUCCIÓN

La propagación *in vitro* o micropropagación es una de las técnicas más estudiadas, con mayores avances y la que más se aplica comercialmente a un mayor número de especies, incluyendo a muchas plantas medicinales (Barba et al. 2001). La propagación de plantas a través de cultivo de tejidos se puede dividir en tres grandes categorías: el enfoque más común consiste en aislar los meristemos organizados como ápices o yemas axilares e inducirlos para convertirse en plantas completas, este sistema de propagación es comúnmente conocida como Micropropagación; en el segundo enfoque, los brotes adventicios se inician en las hojas, raíz y tallo o en segmentos de callos derivados de dichos órganos; el tercer sistema de propagación consiste en la inducción de embriogénesis somática en células y en cultivo de callos (Rout et al. 2000).

Una de las grandes aplicaciones que actualmente se está potencializando en la técnica de cultivo de tejidos, es la producción de compuestos de gran valor para la industria farmacéutica, la cual es un área de extensa investigación dentro de la biotecnología.

La especie *Jacquinia macrocarpa* es endémica del sur de México, utilizada en la medicina tradicional para tratar distintas afecciones, sin embargo, existen muy pocos estudios químicos realizados en este género y otros géneros pertenecientes a esta familia (Rodríguez et al., 1965; Sánchez-Medina et al., 2010).

Algunos de los estudios realizados recientemente en la extracción de metabolitos secundarios determinaron que extractos metanólicos de *Jacquinia* tiene actividad antifúngica y en extractos de corteza de raíz presentan actividad anticancerígena, lo cual significa que esta es una especie de gran interés que representa un valor a nivel farmacéutica y agroindustrial (Bhattacharyya et al., 2000; Rojas et al., 2006)

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) o cultivo *in vitro* vegetal es una poderosa herramienta de la biotecnología moderna, y a grandes rasgos esta tecnología consiste en el uso de partes aisladas de las plantas llamadas explantes y mantenidos en un medio nutritivo artificial aséptico bajo condiciones ambientales controladas (Barba et al., 2001). Este medio nutritivo funciona como un reemplazo de las células, tejidos o elementos conductores originalmente vecinos del explante (Neumann et al., 2009).

Pierik (1990) menciona seis tipos de cultivos *in vitro* o cultivo de tejidos vegetales.

1. Cultivo de plantas intactas: se siembra la semilla *in vitro*, de la cual se obtiene una plántula y finalmente una planta.
2. Cultivo de embriones: se cultiva el embrión aislado después de retirar el resto de los tejidos de la semilla.
3. Se cultiva *in vitro* un órgano aislado (una porción de tejido o un órgano), se pueden distinguir distintos tipos, por ejemplo, cultivo de meristemos, cultivo de ápices del vástago, cultivo de raíces, cultivo de anteras, etc.
4. Cultivo de callo: es un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una diferenciación celular presentando una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido.
5. Cultivo de células aisladas: es el crecimiento de células individuales obtenidas de un tejido, callo o cultivo en suspensión.

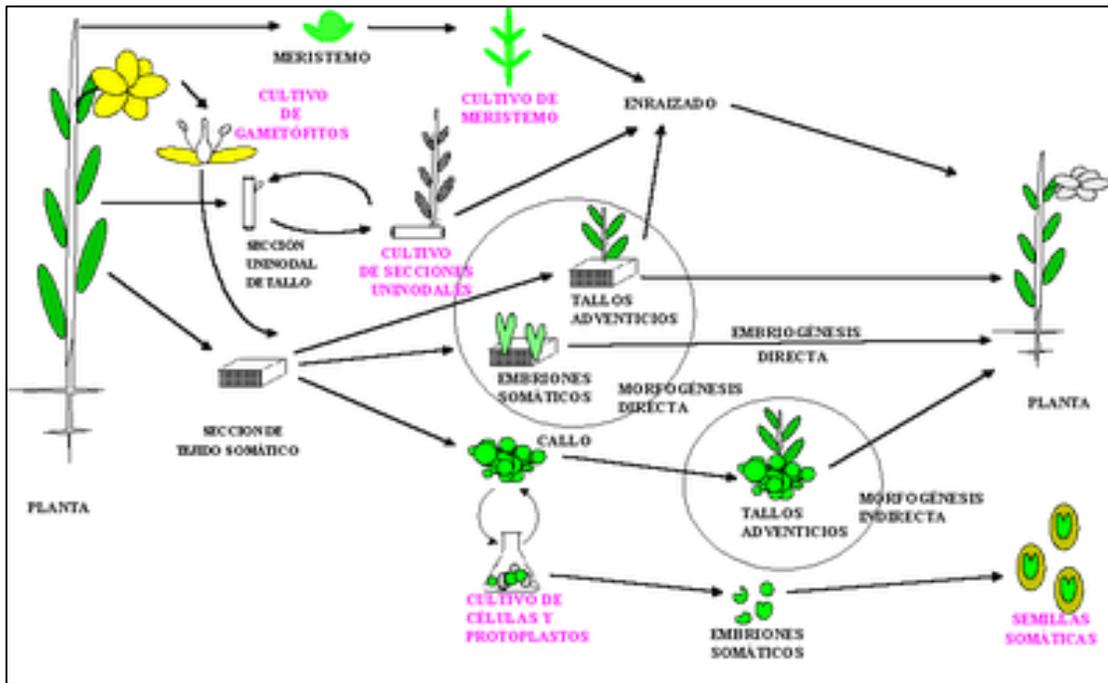
6. Cultivo de protoplastos: se obtiene a partir de células, por digestión enzimática de la pared celular.

## **2.2 Aplicaciones del cultivo de tejidos**

Se debe enfatizar que el cultivo de tejidos vegetales es una serie de técnicas que se utilizan en la investigación y en la producción comercial de productos vegetales y plantas. En el primer caso se ha empleado en estudios de fisiología, bioquímica, morfogénesis, embriología, anatomía, fitomejoramiento y preservación de germoplasma; mientras que en el segundo caso se utiliza en la biosíntesis de productos naturales (saborizantes, colorantes, aromatizantes, fármacos) y en la micropropagación de plantas ornamentales, frutales, forestales y hortícolas (Barba *et al.* 2001)

El cultivo de tejidos vegetales explora condiciones que promueven la división celular y la reprogramación genética en condiciones *in vitro*. Además, se ha convertido en un procedimiento estándar para la biotecnología vegetal y hoy en día, se reconoce cinco grandes áreas donde el cultivo *in vitro* de células es generalmente aplicado (Loyola-Vargas y Vázquez-Flota 2006):

- a) Propagación a gran escala de material elite.
- b) Generación de individuos fértiles genéticamente modificados.
- c) Como modelo de estudio de fisiología celular vegetal.
- d) Preservación de especies en peligro de extinción y recursos fitogenéticos
- e) Para la producción de productos naturales o metabolitos secundarios.



**Figura 1.** Esquema general del cultivo de tejidos vegetales  
Fuente: (Lindsey y Jones 1989)

### 2.3 Metabolitos secundarios

Todas las células vegetales realizan procesos metabólicos comunes que conducen a la formación de compuestos como los azúcares simples, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y polímeros derivados de ellos (polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos entre otros), esenciales para la vida celular, y en general, de toda la planta (Piñol *et al*, 2000).

Estos procesos constituyen, en su conjunto el metabolismo primario, y a los compuestos indicados se denominan metabolitos primarios, los cuales están directamente involucrados en el crecimiento y en el metabolismo. Además de estos procesos metabólicos en las plantas se pueden desarrollar otras rutas que conducen a la formación de compuestos usualmente peculiares de ciertos grupos taxonómicos vegetales (genero, especie o familia) (Ramawat 2007). Estas rutas constituyen el metabolismo secundario y sus productos secundarios se denominan metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales (Piñol *et al*, 2000).

Estos compuestos son considerados como productos finales del metabolismo primario y por lo general no están involucrados en procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, translocación, síntesis de proteínas, asimilación de nutrimentos, diferenciación, formación de carbohidratos, lípidos y proteínas. (Taiz y Zeiger 2006).

La distribución de los metabolitos secundarios en las plantas es mucho más restringida que el de los metabolitos primarios; un compuesto a menudo sólo se encuentra en unas pocas especies, o incluso en unas pocas variedades de una especie (Smetanska 2008).

Además, la biosíntesis de estos metabolitos se restringe también a fases específicas del desarrollo, tanto del organismo como de las células especializadas, y a periodos de estrés causados, por ejemplo, por la deficiencia de nutrimentos, factores ambientales, o el ataque de microorganismos (Piñol *et al.* 2001). También, desempeñan un papel importante en la adaptación de la planta con su entorno, y en su mayoría, tienen un papel ecológico puesto que protegen a las plantas de ser comidas por herbívoros y en contra de ser infestados por patógenos; sirven como atrayentes (olor, color y sabor) de polinizadores, y al ser ingeridas por animales ayudan a la dispersión de las semillas; funcionan también como agentes de competencia entre las plantas y a la simbiosis de microorganismo planta (Bourgaud *et al.*, 2001; Taiz y Zeiger 2006).

Muchas plantas han sido utilizadas desde cientos de años para el tratamiento y cura de las enfermedades infecciosas y no infecciosas, lo que propició una de las bases más importantes para el nacimiento de la medicina (Samuelsson 2004 y Floriani *et al.* 2006).

De acuerdo a Croteau *et al.* (2000), los metabolitos secundarios vegetales se clasifican generalmente en tres grandes familias (terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides).

## 2.4 Rutas morfogénicas

La morfogénesis se define como la formación o la génesis de órganos y comprende el crecimiento y la diferenciación celular. En células o tejidos cultivados in vitro el proceso morfogenético puede inducirse ya que, las células vegetales son capaces bajo determinados estímulos de desdiferenciarse y diferenciarse de nuevo. Esta plasticidad celular se conoce como totipotencia celular. La respuesta morfogenética puede manifestarse siguiendo dos rutas alternativas: la organogénesis y la embriogénesis.

En la organogénesis se produce la formación de tallos, raíces u otras estructuras y en la embriogénesis se forman embriones que al germinar dan lugar a una planta. En ambos casos, el proceso se genera a partir de células somáticas. Si la respuesta primaria al estímulo morfogenético es la formación de callos antes de diferenciarse en meristemas o embriones se habla de organogénesis o embriogénesis indirecta.

En algunas ocasiones se utiliza el término regeneración adventicia que hace referencia a la regeneración que se produce a partir de un lugar que no es el común en el desarrollo de una planta, por ejemplo la regeneración de una planta a partir de un segmento de hoja. Según lo comentado anteriormente, la regeneración adventicia podría incluir plantas regeneradas en un proceso organogénico o en un proceso embriogénico, sin embargo, en cultivo in vitro cuando se utiliza este término generalmente se hace referencia a meristemas adventicios obtenidos por la vía organogénica.

### 2.4.1 Embriogénesis somática

Se puede definir la totipotencia en los vegetales como la capacidad para regenerar un individuo completo a partir de una sola célula. El ejemplo de totipotencia más significativo es la embriogénesis somática. Mediante este proceso se pueden obtener embriones no cigóticos (que no se forman sexualmente) a partir de cualquier tejido vegetal.

Existen algunos ejemplos en vivo como pueden ser los embriones nucleares (embriones asexuales que se forman a partir del tejido somático que rodea el saco embrionario) en semillas de cítricos (naranjos y limoneros) o en hojas de Aranto o Espinazo del Diablo (*Kalanchoe daigremontiana*) (Fig. 2).

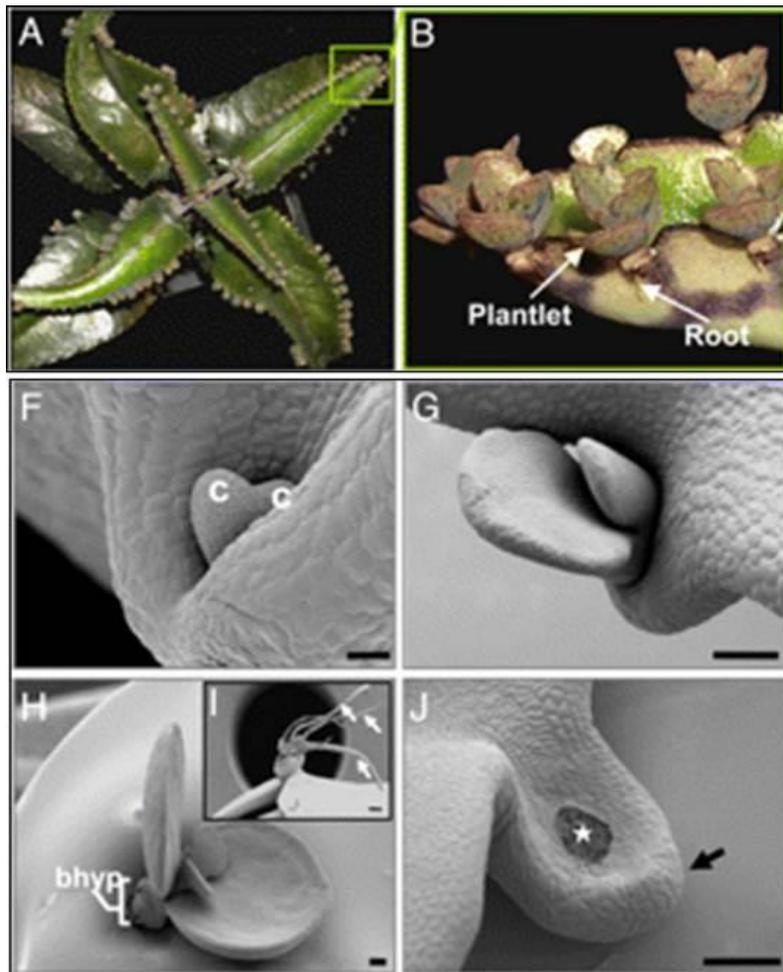


Figura 2.- Embriogénesis nuclear en hojas de Aranto o Espinazo del Diablo (*Kalanchoe daigremontiana*). (A) Planta de *K. daigremontiana*; (B) Detalle de una plántula; (F) estadio corazón y cotiledón; (G) (H) Plántula mostrando el hipocotilo; (I) Plántula mostrando raíces adventicias; (J) Abscisión de una hoja. [Imágenes de: Helena M.P. Garcês et., (2007) Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoë*. Proc Natl Acad Sci USA 104(39): 15578–15583]

Sin embargo, los casos más frecuentes se pueden obtener a partir del cultivo in vitro de tejidos, siendo el modelo más estudiado la zanahoria. En este caso, la mayor parte de los estudios realizados sobre embriogénesis somática se han centrado en los diferentes estadios en que se divide. El primero implica una fase de inducción en la que los tejidos somáticos adquieren directa (sin una desdiferenciación previa) o indirectamente (precedidos de una fase de callo) competencia embriogénica. Esta fase se continúa con la expresión del proceso de embriogénesis somática, en el que las células competentes o pro-embriones inician su desarrollo después de recibir un estímulo adecuado. Los estadios coinciden con los de la embriogénesis cigótica (estadios globular, corazón, y torpedo). Finalmente durante la maduración los embriones somáticos se preparan para la germinación mediante desecación y acumulación de reservas. Fig. 3.

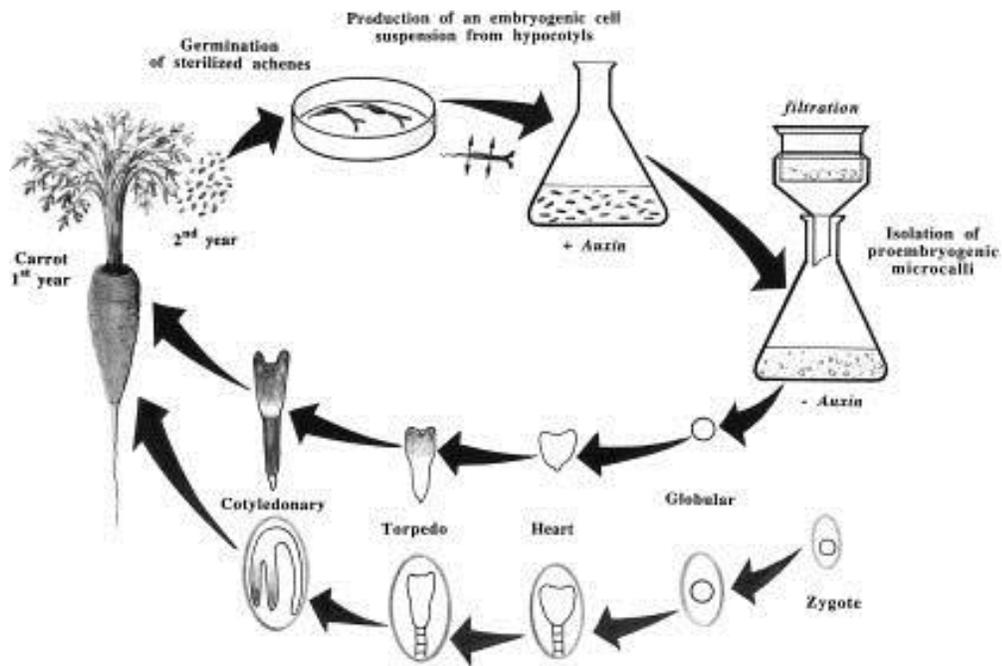


Figura 3.- Embriogénesis cigótica y somática en zanahoria (*Daucus carota*). [Imagen de: V.L. Dodeman et al., (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48:1493–1509]

## **2.4.2 Organogénesis**

La organogénesis es una de las vías morfogénicas en la cual se diferencian meristemas a partir de las células o tejidos cultivados. Cuando se produce un meristemo apical su desarrollo da lugar a una planta.

La organogénesis conduce a la producción de vástagos unipolares que enraízan en etapas sucesivas, mientras que por embriogénesis somática se forman embriones bipolares a través de etapas ontogénicas similares a la embriogénesis cigótica.

La organogénesis puede darse por inducción de yemas axilares o adventicias. La inducción de yemas axilares comprende la multiplicación de yemas preformadas, usualmente sin formación de callo. La inducción de yemas adventicias comprende la inducción de tejido meristemático localizado mediante un tratamiento con reguladores de crecimiento, conduciendo a la diferenciación del primordio y desarrollo del vástago, esto último generalmente en ausencia del regulador de crecimiento que indujo la organogénesis.

### **2.4.2.1 Organogénesis directa**

Es la formación de estructuras bipolares o embrioides a partir de: -tejidos embrionarios (óvulos, nucela, embriones zigóticos, embriones somáticos...) - plántulas muy juveniles (hipocótilo y cotiledones)

### **2.4.2.2 Organogénesis indirecta**

Multiplicación a través del cultivo de callo o indirecta se considera de menor valor la micropropagación obtenida de este modo, debido a la alta incidencia de anomalías cromosómicas producidas como aneuploidías o poliploides. Existen referencias de cultivos regenerativos de callos estables, seleccionados a partir de sectores organogénicos o embriogénicos de callos.

## **2.5 Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)**

Los reguladores de crecimiento vegetal son sustancias que actúan sobre el desarrollo de las plantas y que, por lo general, son activas a concentraciones muy bajas, llevan a cabo funciones reguladoras en células determinadas, regulando el crecimiento, desarrollo o metabolismo del vegetal. Esta actividad reguladora se debe a la interacción de los RCV con receptores específicos en la célula, que al acoplarse entre sí, se activan.

Dentro de este grupo de moléculas podemos diferenciar entre las que son producidas por la planta (origen natural) y aquellas de origen sintético.

Las sustancias consideradas como fitohormonas se clasifican en:

- Auxinas.
- Giberelinas.
- Citocininas.
- Ácido abscísico.
- Etileno.

### 2.5.1 Auxinas

Se denominan auxinas a los compuestos caracterizados por su capacidad de inducir elongación de células. Son sintetizadas en los ápices meristemáticos y en menor cantidad en las raíces.

La auxina principal sintetizada de forma natural por las plantas es el ácido indol acético (AIA).

Auxinas naturales:

- Ácido indol acético (AIA)
- Ácido cloroindol-3-acético (Cl-IAA)

Auxinas sintéticas:

- Ácido indol-3-butírico (IBA)
- Ácido fenilacético (PAA)
- Ácido naftalen acético (ANA)
- Ácido 2- metoxi, 3,6-Diclorobenzoico (dicamba)
- Ácido 2,4- Diclorofenoxiacético (2,4-D)
- Ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético (2,4,5-T)

Las auxinas inducen una gran diversidad de efectos fisiológicos, entre los más significativos destacan:

- Aumento de la extensibilidad de la pared celular.
- Participación en la diferenciación celular.
- Estimulación de foto y gravitropismo.
- Estimulación del desarrollo del fruto después de la fecundación
- Regulación de la abscisión.

### 2.5.2 Giberelinas

Las giberelinas son fitorreguladores que son sintetizados en muchas partes de la planta, pero más especialmente en áreas de crecimiento activo como los embriones o tejidos meristemáticos. A la fecha, se han identificado cerca de 112 giberelinas diferentes y se denominan sucesivamente GA<sub>1</sub>, GA<sub>2</sub>, GA<sub>3</sub>, etc (Rojas-Garcidueñas & Rovalo 1985).

El GA<sub>3</sub> es el único de uso comercial y se conoce como ácido giberélico. Las giberelinas actúan fundamentalmente sobre el RNA desinhibiendo genes. Esta acción está bien caracterizada con respecto a dos genes que en ausencia de giberelina están reprimidos: *α*-amilasa y los genes para el alargamiento normal de los entrenudos del tallo. Existe un receptor para la giberelina en la capa de aleurona de la semilla. El GA<sub>3</sub> induce la síntesis de *α*-amilasa, que es la enzima que toma parte en la desintegración de las reservas de almidón durante la germinación de las semillas. Debido a esta función, es bien conocido su uso como promotor o induc-tor de la germinación en diversos tipos de plantas (Lewak & Khan 1977; Bewley & Black 1994; Baskin & Baskin 1998; Tigabu & Odén 2001).



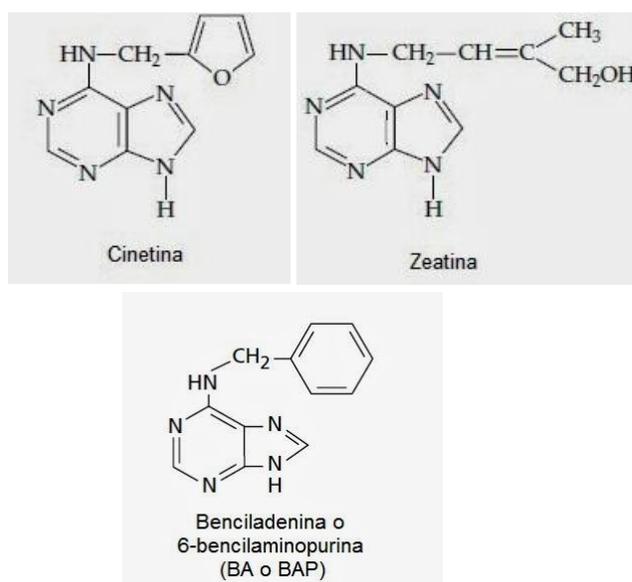
Figura. 4 Estructura del ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).

Las giberelinas se encuentran involucradas en el control de procesos de control claves en el desarrollo de las plantas:

- Elongación de tallos
- Movilización endospermática
- Floración
- Fructificación

### 2.5.3 Citocininas

Las citocininas o citoquininas influyen en el crecimiento vegetal de varias maneras, incluidos el control de la división y diferenciación celulares, contrarrestando la dominancia apical, y retrasando el envejecimiento de las hojas. El nombre de citocininas se refiere a su papel en la división celular o citocinesis. Las citocininas se sintetizan en la raíz y se transportan a través del xilema a otros órganos de la planta, donde fomentan de manera general un estado más juvenil de desarrollo.



**Figura. 5** Estructura de citocininas.

## 2.6 Generalidades de *Jacquinia macrocarpa*

*Jacquinia macrocarpa* es un género perteneciente a la familia Theophrastaceae constituida por seis géneros y alrededor de 100 especies. El género *Jacquinia*, consta de 22 especies, distribuidas en Mesoamérica, el norte y el oeste de América del Sur, y en las Antillas Mayores (Stahl y Källersjö, 2004). En el estado de Chiapas, *Jacquinia macrocarpa* es conocido popularmente como Siqueté profeta o arbolito de navidad y es utilizado como planta ornamental y de traspatio.

*Jacquinia macrocarpa* es una planta arbustiva que mide de 2 a 5 m, considerado árbol pequeño de tallo monopodial, ramificado desde la base, color pardo oscuro. Las hojas son lineares de 1.5 – 6 cm largo y 0.3-2.0 cm de ancho, generalmente agrupadas en fascículos hacia el ápice de las ramas, glabras, la nervadura central prominente, nervaduras secundarias reticuladas inconspicuas, base aguda a redondeada, sus flores miden de 0.8, 1.2 cm de largo, son de color anaranjado. Su fruto es una baya, esférica a semiesférica verde- amarilla, anaranjado en su madurez; sus semillas miden de 6.0-7.0 mm de largo, 4.0-5.0 mm de ancho, 1.0-2.0 mm de grosor, son oblongas a elípticas, de color verde amarillentas (Fig.1).

Esta especie, habita en lugares alterados por matorrales xerófilos, en bosques de *Quercus* y lugares sombreados de bosque tropical caducifolio, florece de Marzo a Mayo y fructifica de Mayo a Diciembre; se propaga en la naturaleza por medio de las semillas de su fruto maduro.

Esta es una especie endémica del sur de México, utilizada en la medicina tradicional para tratar la tos y dolor de garganta, llagas en la boca y dolor de muelas (Osadao, 1834).



**Figura6.** Planta de *Jacquinia macrocarpa*

Fuente:[http://toptropicals.com/catalog/uid/jacquinia\\_aurantiaca.htm](http://toptropicals.com/catalog/uid/jacquinia_aurantiaca.htm)

### **2.6.1 Trabajos realizados**

En esta especie, pocos estudios químicos han sido realizados (Sánchez-Medina et al., 2010) y otros géneros pertenecientes a esta familia, pero ha generado interés por los recientes trabajos realizados en esta especie (Bhattacharyya et al., 2000; Rojas et al., 2006). Actualmente no se ha documentado algún protocolo de Micropropagación de esta especie.

### **2.6.2 Metabolitos secundarios de *Jacquinia macrocarpa***

En estudios realizados recientemente en esta especie se analizó que extractos de corteza de raíz de *Jacquinia macrocarpa* presenta actividad antiproliferativa de MeOH (Caamal-Fuentes et al., 2011). Este extracto mostró actividad contra KB, HeLa y Hep-2 que son tres líneas celulares de cáncer humano. Sin embargo no se han realizado estudios fitoquímicos sobre esta especie.

Este compuesto se considera un nuevo alquil que fué nombrado bonediol, por ser aislado a partir de la corteza de raíz de nuestra especie en estudio, *Jacquinia macrocarpa* es llamada recientemente por *Bonellia macrocarpa* de acuerdo a Caamal-Fuentes Edgar, et al. 2011.

En otro estudio realizado en la Universidad de Sonora, se determinó que en fracciones de extractos metanólicos purificados de *Jacquinia macrocarpa* presenta un efecto contra hongos fitopatógenos como el *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Fusarium verticillioides* (Valenzuela Sosa, et al., 2014)

## **2.7 Micropropagación**

En la actualidad se han desarrollado técnicas que permiten obtener plantas libres de agentes patógenos, conservando la variedad genética y que permita la multiplicación masiva de plantas, en forma rápida, eficiente y en grandes cantidades y que representan una importancia económica, dentro de estos métodos se encuentra la Micropropagación. (Fabbri *et al.*, 2004).

La micropropagación permite utilizar plantas nativas en vías de extinción, o plantas difíciles de propagar por otros métodos que permite la conservación y autenticidad de la especie, así como también mejoramiento genético de especies que tienen características agronómicas deseables (mejores frutos, resistentes a las sequías, etc.) además de que por este método se obtienen plantas libres de patógenos (hongos, virus, bacterias).

Las ventajas de este método es que permite obtener muchos individuos iguales en una pequeña superficie, controlar las condiciones ambientales, estudiar diversos procesos de las plantas y evita el riesgo de que proliferen agentes patógenos ya que se realiza en medios esterilizados.

Constituye uno de los métodos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura. Se aplica en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales.

El proceso de Micropropagación consta de cinco etapas:

- Selección de material genético.
- Desinfección de los explantes (establecimiento de condiciones asépticas).
- Adaptación de explantes al medio de cultivo (multiplicación de brotes).
- Enraizamiento (formación de raíces con el fin de convertir los brotes en plántulas completas)
- Aclimatación de las plántulas obtenidas in vitro a las condiciones medioambientales ex vitro.

### **Selección de material genético**

En esta etapa se utilizaron semillas de *Jacquinia macrocarpa*, que se encuentran almacenadas en condiciones óptimas en el Laboratorio de Cultivos Vegetales del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

### **Desinfección de semillas (establecimiento de condiciones asépticas)**

El objetivo de esta etapa es la desinfección de las semillas para garantizar que se encuentren libres de agentes patógenos como hongos y bacterias, estableciendo las condiciones asépticas. Para la desinfección se puede hacer uso de agentes antimicrobianos, antimicóticos, etanol, hipoclorito de sodio (cloro) y agua destilada.

Una vez desinfectado nuestro material se debe procurar mantener las condiciones asépticas, para ello es importante mencionar que, el material con que se manipula, debe encontrarse previamente esterilizado (Sheehy et al., 2015).

### **Adaptación de explantes al medio de cultivo**

En este caso al utilizar semillas como nuestro material en estudio, dividimos esta parte en dos etapas importantes: germinación e inducción (multiplicación de brotes).

#### **Germinación**

El objetivo de esta etapa es obtener semillas germinadas, usando medio suplementado con GA<sub>3</sub> a distintas concentraciones: 1,2 y 4 mg/L para evaluar su efecto y determinar cuál es la concentración óptima que garantice el mayor porcentaje de germinación.

#### **Inducción (multiplicación de brotes)**

Se utilizarán las hojas e hipocótilos de las plántulas obtenidas en la germinación de las semillas, para la inducción y evaluar cuál es el efecto de las hormonas BAP (6-bencil amino purina), AIA (ácido-indol acético) y 2,4-D (ácido. 2,4 diclorofenoxiacético).

Durante esta fase se espera que los explantes originen brotes o callos, luego de ser expuestas al medio de cultivo, ya que este es quien proveerá nutrimentos necesarios para que nuestros explantes se desarrollen. La respuesta que se desea obtener dependerá de los ingredientes del medio en el que se cultive el explantes y de la hormona que se utilice.

## **Enraizamiento**

En esta etapa se formarán las raíces que son el soporte de la planta en el cultivo *ex vitro*, ya que son estas quienes permiten la absorción de agua y nutrientes necesarios para la supervivencia de la nueva planta.

Es importante destacar que el tipo de enraizamiento y la facilidad con que esta etapa se logre dependerá de la especie y de la cantidad de auxinas a utilizar.

Dentro de las más usadas están ácido indol butírico (IBA), ácido 4-cloro-indolacético (4-Cl-IAA), ácido naftalen – acético (NAA) y ácido fenilacético (PAA) (Jordán y Casaretto,2006).

## **Aclimatación**

Esta es la etapa crítica de la micropropagación por el cambio drástico de la planta en las condiciones de luminosidad, humedad, asepsia principalmente.

En este paso las plantas asépticas don colocadas en suelo estéril en bolsas de polietileno y se regaran paulatinamente con una solución de nutrientes menos complejo de manera que la planta se adapte paulatinamente a los cambios de invernadero, sin los reguladores del medio in vitro y condiciones climáticas del ambiente externo, para evitar así provocarle estrés (Chaari Rkhis et al., 2011).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Bonellia macrocarpa* es una especie poco estudiada y de la cual se han realizado pocos estudios científicos, antiguamente era utilizada para tratar afecciones de la garganta, como la tos y dolor de muelas.

Es conocida popularmente como Siqueté o profeta en algunas regiones de Chiapas donde actualmente la utilizan como cerca viva, usan la corteza de este para matar pescados en los ríos y lagunas y los zoques lo utilizaron como arbolito de navidad; aunque la mayoría de las veces es considerada una planta maleza por agricultores y ganaderos deciden talar estos árboles destruyendo su hábitat y acabando con un gran número de ejemplares pertenecientes a la especie y deforestando grandes extensiones de bosques.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

*Bonellia macrocarpa* es una especie nativa de nuestro estado de Chiapas y representa una herramienta útil para proporcionar nuevos medios para la producción de metabolitos secundarios con interés farmacéutico y agroindustrial, por los recientes estudios sobre esta especie en ambas ramas, además de generar fuentes alternas de trabajo a agricultores que deseen integrarse al trabajo de cultivo y conservación de esta especie de gran interés científico.

Por ello surgen alternativas como lo es la micropropagación *in vitro*, que permite la multiplicación masiva de especies, que nos permitirá reforestar terrenos y aumentar el número de ejemplares de la especie utilizando este método de propagación, obtener plantas mejoradas genéticamente que nos proporcionen mayores rendimientos en cuanto a la producción y extracción de metabolitos.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Analizar el efecto del ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Jaquinia macrocarpa*. Adicionalmente se evaluar el efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal y distintos explantes sobre las respuestas morfogénicas con la finalidad de establecer un protocolo para micropropagar la especie.

### 5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones del ácido Giberelico GA sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Jacquinia macrocarpa*.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de BAP (6-bencil amino purina), AIA (ácido-indol acético) y 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), utilizando hipocótilos y hojas como explantes en la generación de respuestas morfogénicas.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material vegetal

Se seleccionaron semillas de *Jacquinia macrocarpa* proporcionadas por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, donde las mantienen en almacenamiento en condiciones de temperatura ambiente para garantizar su sobrevivencia. Figura 7.



**Figura 7.** Semillas de *Bonellia macrocarpa*

Autor: Brenda Ivonne Vázquez Ramírez, "Laboratorio de Cultivos Vegetales ITTG".

### 6.2 Medio de cultivo

El medio utilizado fué MS (Murashige & Skoog, 1962), el cual se preparó por soluciones concentradas las cuales se encontraban constituidas de la siguiente manera. (Cuadro 1)

**CUADRO 1. Soluciones STOCK del medio MS**

SOLUCIONES	CANTIDAD
<b>SOLUCION A.</b> Concentración 1000 X Volumen: 50 ml <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cloruro de calcio (Ca-Cl<sub>2</sub>-2 H<sub>2</sub>O)</li> </ul>	22.0 g
<b>SOLUCION B.</b> Concentración 1000 X Volumen: 50 ml <ul style="list-style-type: none"> <li>• Yoduro de potasio (KI)</li> <li>• Cloruro de cobalto (CoCl<sub>2</sub>- 6 H<sub>2</sub>O)</li> </ul>	41.50 mg 1.25 mg
<b>SOLUCION C.</b> Concentración 400 X Volumen: 50 ml <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fosfato monobásico de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</li> <li>• Ác. bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)</li> <li>• Molibdato de sodio (NaMoO<sub>4</sub>)</li> </ul>	3.400 g 0.124 g 0.005 g
<b>SOLUCION D.</b> Concentración 400 X Volumen: 50 ml <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)</li> <li>• Sulfato de manganeso (MnSO<sub>4</sub>- H<sub>2</sub>O)</li> <li>• Sulfato de zinc (ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)</li> <li>• Sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O)</li> </ul>	7.400 g 0.340 g 0.172 g 0.50 g
<b>SOLUCION E.</b> Concentración 200 X Volumen: 100 ml <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>-7 H<sub>2</sub>O)</li> <li>• EDTA disódico (Na<sub>2</sub> EDTA)</li> </ul>	0.557 g 0.745 g
<b>SOLUCION F.</b> Concentración 100 X Volumen: 100 ml <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicina</li> <li>• Piridoxina HCl</li> <li>• Ac. Nicotínico</li> <li>• Tiamina HCl</li> <li>• Mio inositol</li> </ul>	20.0 mg 5.00 mg 5.00 mg 1.00 mg 1.00 g

Para la solución E se disolvieron ambos componentes por separado, el cual requiere calentar. Agregar poco a poco la solución Fe a la de EDTA y aforar. Debe quedar color amarillo sin precipitados.

### 6.3 Preparación de medio MS

Preparación para 1 litro de medio

En un vaso de precipitados de 1 L se colocaron 850 ml de H<sub>2</sub>O destilada, agregando en volumen indicado de las soluciones concentradas (Cuadro 2). Posteriormente, se pesó, añadió y agitó hasta disolver los compuestos que sirvieron como fuente de nitrato y carbono (Cuadro 3). Se aforó a 1 L con H<sub>2</sub>O destilada, fueron agregados los reguladores de crecimiento vegetal (Cuadro 4) y se ajustó el pH del medio a 5.7 con NaOH o HCl 0.1 N. Por tratarse de un medio sólido se pesó y agregó 2.5 gramos de gelificante Phytigel®, el cual se disolvió calentando. Finalmente se distribuyeron en recipientes de cultivo con 20 ml de medio y se esterilizaron en autoclave a 15 lb por 15 minutos.

**Cuadro 2.** Cantidad de soluciones Stock para medio MS

<b>Solución</b>	<b>Volumen (ml)</b>
A	1
B	1
C	2.5
D	2.5
E	5
F	10

**Cuadro 3.** Fuente de nitrato y carbono

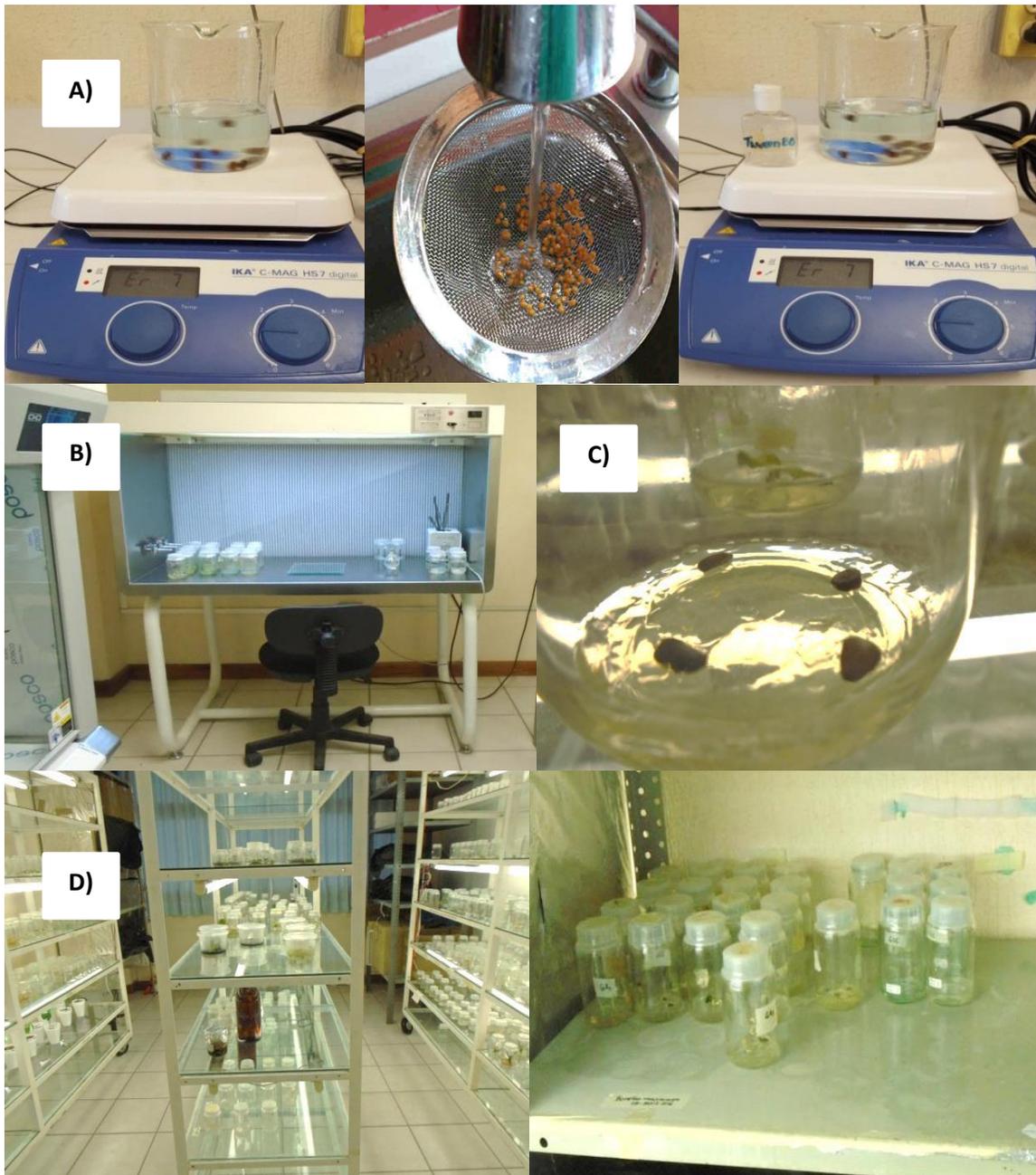
<b>Compuestos</b>	<b>Cantidad (g)</b>
Sacarosa	30
Nitrato de potasio	1.90
Nitrato de amonio	1.65

**Cuadro 4.** Cantidades de reguladores de crecimiento

<b>Respuesta</b>	<b>Regulador</b>	<b>Cantidad (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
Germinación	GA <sub>3</sub>	1.0, 2.0 y 4.0
R. Morfogénica	BAP	0.5, 1.0 y 2.0
R. Morfogénica	2,4-D	0.5, 1.0 y 2.0
R. Morfogénica	AIA	0.5, 1.0 y 2.0

#### 6.4 Desinfección de semillas

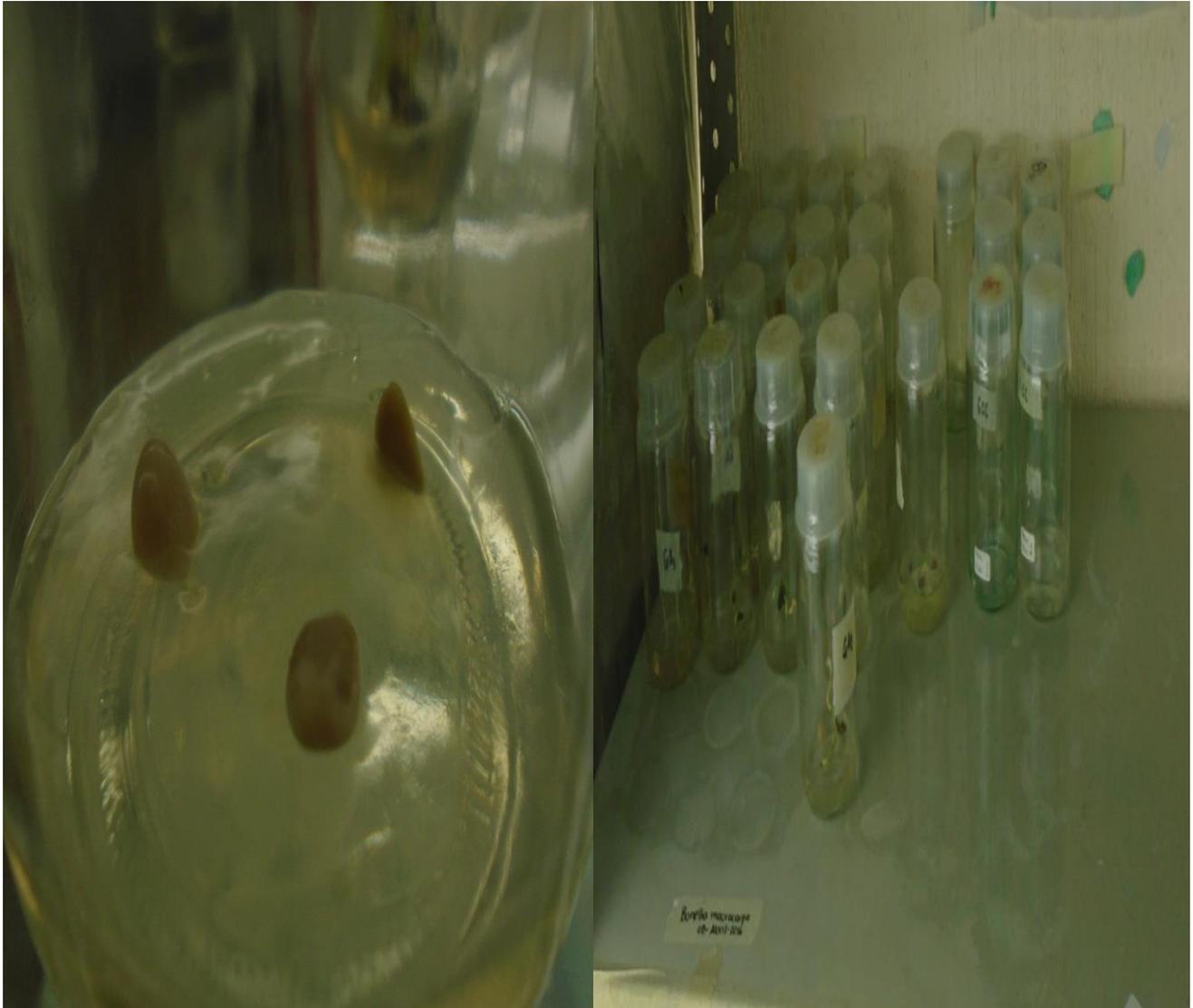
Se lavaron las semillas con detergente líquido comercial Axió por 5 minutos con agua corriente en agitación constante. Para eliminar el detergente las semillas fueron enjuagadas con agua del grifo, posteriormente, se colocaron en una solución de agua destilada con 2 gotas de tween 80 por 15 minutos manteniéndolas en agitación, de la misma manera se enjuagaron; esta vez con agua destilada. En condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, las semillas se colocaron en una solución de etanol al 70% durante 3 minutos en agitación constante, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril con 5 minutos por enjuague. Posteriormente se depositaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 30% durante 15 minutos. Finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril 3 veces. Fig. 8.



**Figura 8.** Desinfección de semillas de *Jacquinia macrocarpa*. A) Lavado de las semillas con jabón comercial, enjuague y lavado con tween 80. B) Desinfección y manipulación de las semillas en condiciones de esterilidad. C) Semillas sembradas en medio MS. D) Cámara bioclimática/condiciones de oscuridad y temperatura controlada. Autor: Brenda Ivonne Vázquez Ramírez, "Laboratorio de Cultivos Vegetales ITTG".

### 6.5 Germinación de semillas:

Las semillas previamente desinfectadas fueron colocadas en frascos Gerber con 20ml de medio MS, suplementado con GA<sub>3</sub> (ácido giberélico) a 1.0 mg/L, 2.0 mg/L y 4.0 mg/L. Los frascos fueron colocados en la cámara bioclimática en condiciones de oscuridad, en un periodo de 45 días aproximadamente. Fig. 9



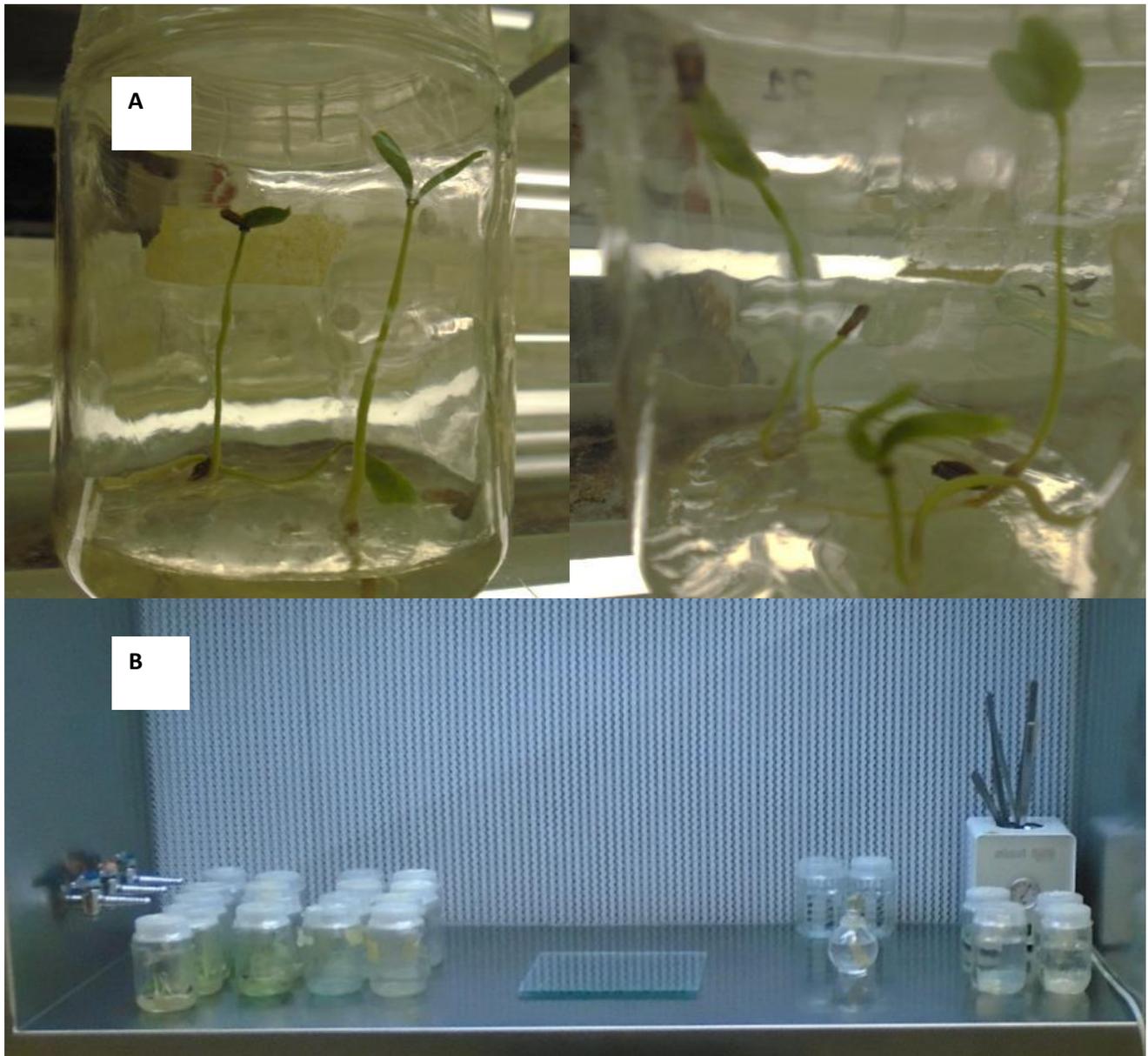
**Fig.9** Semillas de *Jacquinia macrocarpa* en medio MS (respuesta germinativa) Autor: Brenda Ivonne Vázquez Ramírez Laboratorio de *Cultivos vegetales* ITTG.

## **6.6 Inducción de respuestas morfológicas**

En un periodo de 75 días se obtuvieron plántulas como resultado de la germinación de las semillas mismas que se utilizaron para la etapa de inducción y evaluar el efecto de la respuesta morfológicas de los reguladores de crecimiento vegetal sobre los explantes.

Se seleccionaron las plántulas que tenían hipocótilo verde de buen tamaño con hojas.

En condiciones de esterilidad usando pinzas estériles, se sacaron del medio de germinación, se colocaron en vidrio de disección previamente estéril y con bisturí estéril se diseccionaron por partes; se tomaron como explantes únicamente hipocótilos y hojas que posteriormente se sembraron en frascos de cultivo con 20 ml de medio MS suplementado de manera individual con BAP (6-bencil amino purina), AIA (ácido-indol acético) y 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) a diferentes concentraciones  $0.5 \text{ mg/L}^{-1}$ ,  $1.0 \text{ mg/L}^{-1}$  y  $2.0 \text{ mg/L}^{-1}$  para el análisis de respuestas morfológicas. Fig. 10 y 11.



**Fig.10** Inducción de respuestas morfogénicas en explantes de *Bonellia macrocarpa*. A) Selección de plántulas B) Condiciones de esterilidad Autor: Brenda Ivonne Vázquez Ramírez Laboratorio de Cultivos vegetales ITTG.



**Fig.11** Inducción de respuestas morfogénicas en explantes de *Bonellia macrocarpa*. A) Plántulas de *Bonellia macrocarpa* B) Corte de hojas e hipocótilos. Autor: Brenda Ivonne Vázquez Ramírez Laboratorio de *Cultivos vegetales ITTG*.

Los frascos sembrados fueron colocados en la cámara bioclimática con luz y temperatura controlada para ser evaluadas durante un período de 30, 60 días.

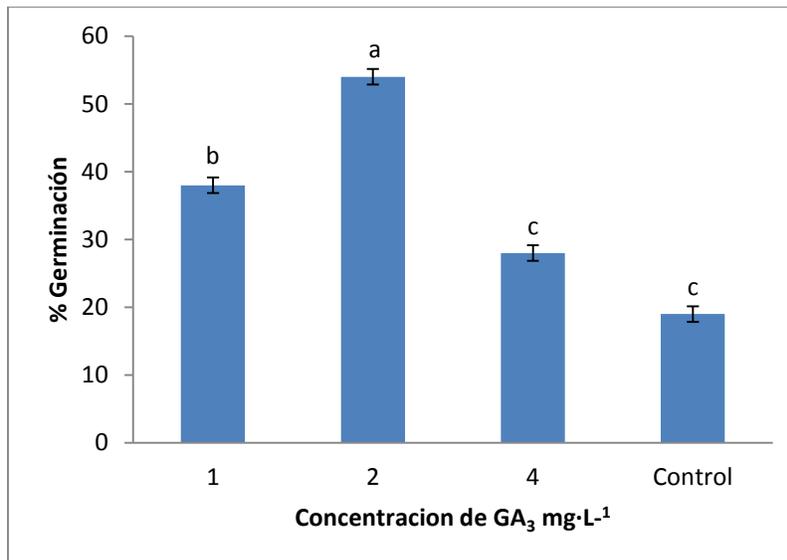
### **6.7 Análisis estadístico de la germinación**

Los resultados fueron analizados a través de un análisis de varianza y comparación de medias mediante el test de Tukey's ( $P \leq 0.05$ ), utilizando el software statgraphic centurión XV1.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Germinación

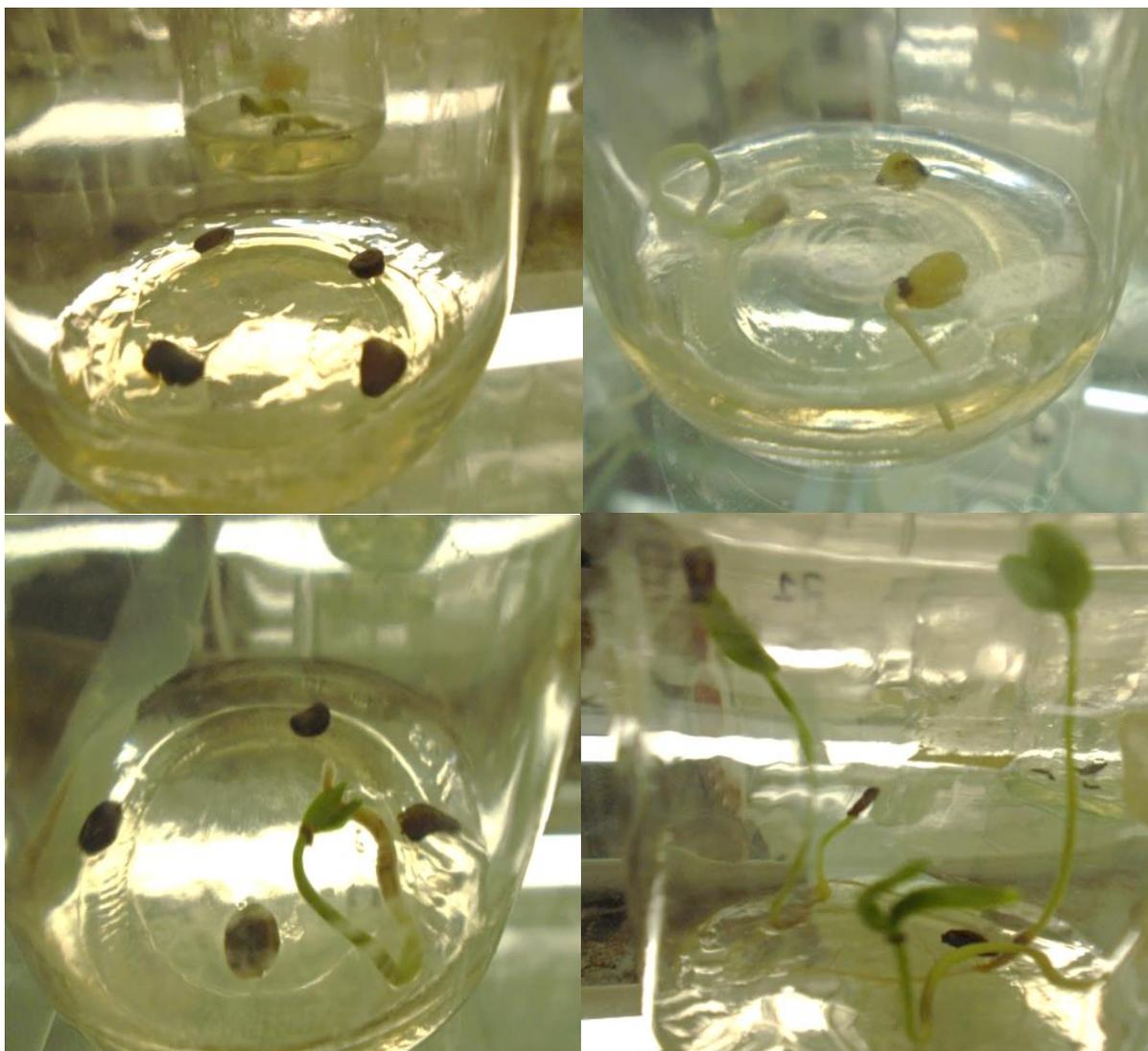
La germinación de las semillas de *Bonellia macrocarpa* se inició 45 días después de la siembra. El GA utilizado en diferente concentración, estimuló la germinación para todos los tratamientos (Gráfica. 1). La germinación se consideró al aparecer la radícula.



Gráfica 1. Efecto en la germinación de semillas de *Bonellia macrocarpa* a diferentes concentraciones de GA.

La forma de propagación de muchas especies vegetales es por semilla; sin embargo, algunas consideradas viables son incapaces de germinar, esta característica se denomina latencia, mecanismo de supervivencia a condiciones adversas del clima como: temperaturas bajas, alternancias de épocas secas y húmedas y climas desérticos, esto resulta poco ventajoso cuando se pretende cultivarlas (Fuentes *et al.* 1996 a, b). Las giberelinas están implicadas directamente en el control y promoción de la germinación de las semillas; el ácido giberélico (AG3) puede romper la latencia de las semillas y remplazar la necesidad de estímulos ambientales, tales como luz y temperatura (Araya *et al.* 2000).

El tratamiento donde se utilizó 2.0 mg/L de GA<sub>3</sub> fue el tratamiento que presentó mayor porcentaje de germinación con un 54% comparada con los tratamientos de 1.0 y 4.0 mg/L de GA<sub>3</sub>, misma que al comparar con el tratamiento control el cual presentó un porcentaje de germinación de 21.33% observamos que duplica el porcentaje de germinación. Por otra parte el tratamiento donde se adicionó 1.0 mg/L de GA<sub>3</sub> es el segundo tratamiento que presentó un mayor porcentaje de germinación comparada con el tratamiento de 4.0 mg/L de GA<sub>3</sub> y el tratamiento control. Figura. 12



**Fig.12** Germinación de semillas de *Jacquinia macrocarpa*. Autor: Brenda Ivonne Vázquez Ramírez Laboratorio de *Cultivos vegetales ITTG*.

## 7.2 Inducción de respuestas morfológicas.

La inducción se evaluó en un periodo para analizar la generación de respuestas morfológicas en un periodo de 30 y 60 días. A continuación se presentan los Cuadros de los distintos tratamientos utilizados para la inducción de respuestas morfológicas en la multiplicación de brotes.

**Cuadro 5.** Respuesta del efecto de **AIA** en explantes de *Bonellia macrocarpa*

RCV: AIA Concentración (mg.L <sup>-1</sup> )	RESPUESTA						NÚMERO DE BROTES			
	Organ.		Callo		E.S.		30 días		60 días	
	Hoja	Hip.	Hoja	Hip.	Hoja	Hip.	Hoja	Hip.	Hoja	Hip.
0.5	-	+	-	+	-	-	SR	2	SR	5
1.0	-	+	-	-	-	-	SR	3	SR	10
2.0	+	+	+	+	-	-	SR	SR	20	15

Signo (+) es significado de que sí hubo respuesta en el explante indicado de lo contrario se señala con signo(-) en cuanto a la generación de respuesta, SR (sin respuesta)

Para el tratamiento de AIA en la concentración de 0.5 mg.L<sup>-1</sup> a los 30 días se obtuvieron callos organogénicos color verde más 2 brotes en hipocótilos únicamente (organogénesis indirecta). 60 días después de la inducción se observó la formación de callo compacto verde en la parte del corte del hipocótilo con obtuvieron 5 brotes organogénicos, las hojas no generaron respuesta. En el tratamiento de 1.0 mg.L<sup>-1</sup> no hubo respuesta a los 30 días en hojas, en hipocótilos se formaron 3 brotes (organogénesis directa); a los 60 días hubo formación de brote organogénico en hipocótilos con 10 brotes por explantes. La concentración de 2.0 mg.L<sup>-1</sup> no generó respuesta a los 30 días en ambos explantes después de la inducción; a los 60 días se obtuvo callo organogénico color verde con 20 brotes en hojas y 15 brotes en hipocótilos.

Aunque en las concentraciones de 0.5 y 1.0 mg.L<sup>-1</sup> se obtuvieron respuestas de organogénesis a los 30 días en hipocótilos, la concentración óptima para obtener un mayor número de brotes fue la de 2.0 mg.L<sup>-1</sup> por vía organogénesis indirecta ya que se obtuvo primeramente callos y después la formación de brotes. Figura 13.



**Fig.13** Efecto de AIA (ácido indol acético) en explantes de *Bonellia macrocarpa* 60 días después de la inducción A) Organogénesis directa en hipocótilos a 0.5 mg.L<sup>-1</sup> B) formación de brotes en hipocótilo en 1.0 mg.L<sup>-1</sup> C) y D) Callo organogénico en la concentración de 2.0 mg.L<sup>-1</sup>. Autor: Brenda Ivonne Vázquez Ramírez Laboratorio de Cultivos vegetales ITTG.

Para el tratamiento con BAP a  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  se obtuvieron a los 30 días callos compactos color verde en hipocótilos y hojas en zona de corte. A los 60 días después de la inducción se observa mayor masa de callos de color verde. A  $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$  se obtuvo organogénesis directa con 1 brote en hipocótilos, en las hojas no hubo respuesta a los 30 días, para los 60 días se formó 7 brotes en hojas y 18 brotes en hipocótilos (organogénesis directa). Para la concentración de  $2.0 \text{ mg.L}^{-1}$  se formó a los 30 días callo compacto color crema en hojas y en hipocótilos no se generó respuesta; pero a los 60 días después de la inducción se formaron 60 brotes en hojas y 40 en hipocótilos.

**Cuadro 6.** Respuesta del efecto de **BAP** en explantes de *Bonellia macrocarpa*

RCV: BAP Concentra- ción ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	RESPUESTA						NÚMERO DE BROTES			
	Organ.		Callo		E.S.		30 días		60 días	
	Hoja	Hip.	Hoja	Hip.	Hoja	Hip.	Hoja	Hip.	Hoja	Hip.
0.5	-	-	+	+	-	-	Callo verde	Callo verde	Callo verde	Callo verde
1.0	-	+	-	-	-	-	SR	1	7	18
2.0	-	+	-	+	-	-	Callo crema 5	SR	30	40

Signo (+) es significado de que sí hubo respuesta en el explante indicado de lo contrario se señala con signo(-) en cuanto a la generación de respuesta, SR (sin respuesta)

La concentración  $1.0$  y  $2.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP fueron las más significativas por obtener brotes vía organogénesis directa la concentración donde se obtuvo mayor número de brotes fue a  $2.0 \text{ mg.L}^{-1}$ . Figura 13.



**Fig.14** Efecto de BAP (6-bencilaminopurina) en explantes de *Bonellia macrocarpa* 60 días después de la inducción A) y B) Callo compacto verde en hipocótulo y hojas en 0.5 mg.L<sup>-1</sup> C) formación organogénesis directa en hipocótulo a 1.0 mg.L<sup>-1</sup> D) Callo organogénico en hoja a una concentración de 2.0 mg.L<sup>-1</sup>. Autor: Brenda Ivonne Vázquez Ramírez Laboratorio de Cultivos vegetales ITTG.

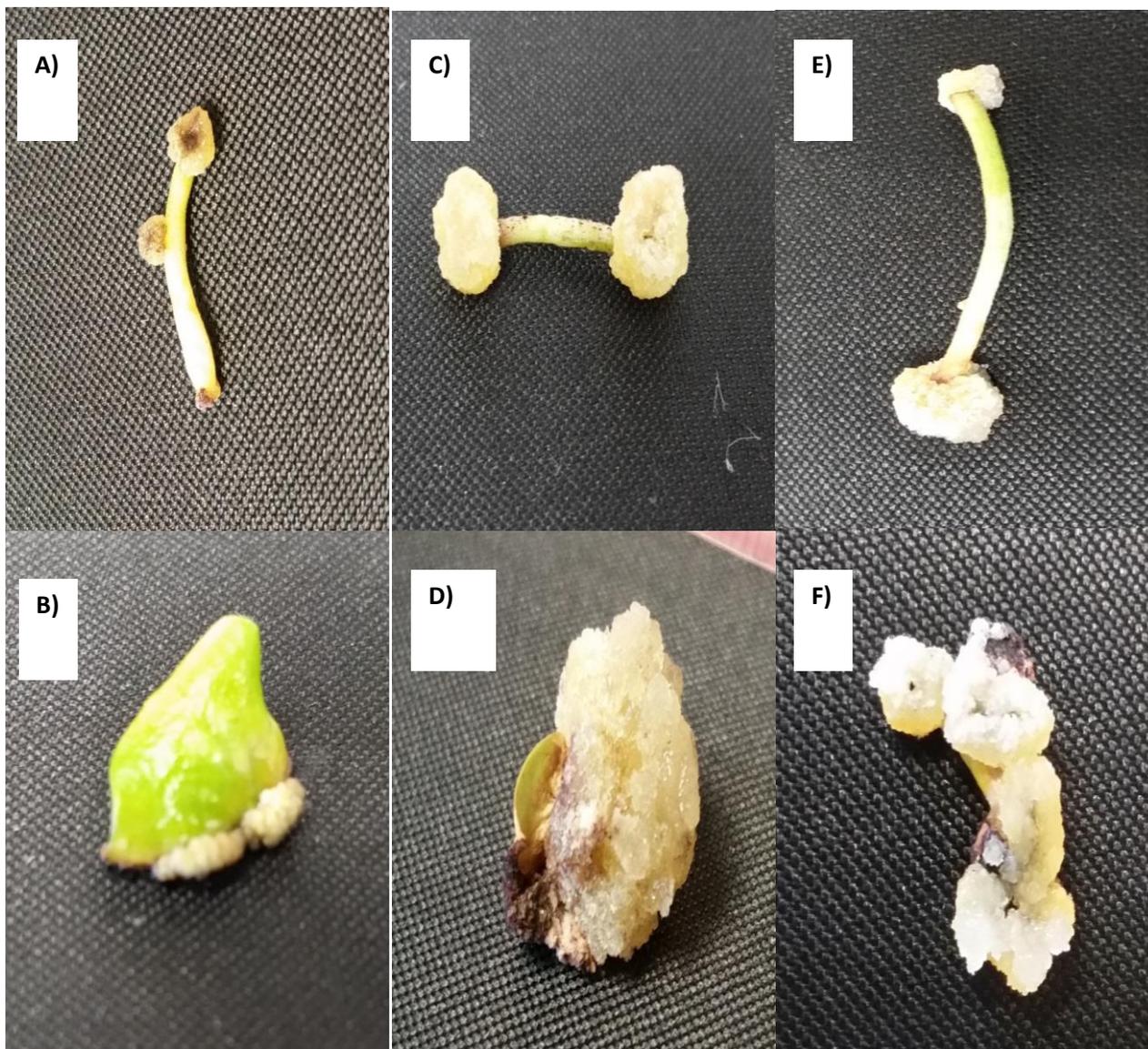
**Cuadro 7.** Respuesta del efecto de **2,4-D** en explantes de *Bonellia macrocarpa*

RCV: 2,4-D Concentración (mg.L <sup>-1</sup> )	RESPUESTA						NÚMERO DE BROTES			
	Organ.		Callo		E.S.		30 días		60 días	
	Hoja	Hip.	Hoja	Hip.	Hoja	Hip.	Hoja	Hip.	Hoja	Hip.
0.5	-	-	+	+	-	-	Callo crema compacto	Callo crema compacto*	Callo crema compacto	Callo crema compacto*
1.0	-	-	+	+	-	-	Callo crema friable	Callo crema compacto*	Callo crema compacto	Callo crema compacto*
2.0	-	-	+	+	-	-	Callo crema compacto*	Callo crema compacto*	Callo crema compacto*	Callo crema compacto*

Signo (+) es significado de que sí hubo respuesta en el explante indicado de lo contrario se señala con signo(-) en cuanto a la generación de respuesta, SR (sin respuesta)

Para el tratamiento de 2,4 D se obtuvieron callos compactos de color crema para todos los explantes de hojas e hipocótilos, aquí se observó la generación de respuesta a partir de los 30 días después de la inducción.

Para la concentración 0.5 mg.L<sup>-1</sup>, a los 30 días se formó callo compacto color crema en hipocótilo, en hojas se observó la posible formación de callos en la periferia de la hoja; en 1.0 mg.L<sup>-1</sup> en hojas se obtuvieron a los 30 días callos color crema con textura friable y en hipocótilos callos compactos color crema, a los 60 días se observó la fenolización de los explantes. En la concentración de 2.0 mg.L<sup>-1</sup> tanto en hojas e hipocótilos se obtuvieron a los 30 días callos color crema de textura compacta, se presenta fenolización. Fig. 14.



**Fig.15** EFECTO DE 2,4-D (ácido. 2,4 diclorofenoxiacético) en explantes de *Bonellia macrocarpa* 30 días después de la inducción A) y B) Callo compacto crema en hipocótilo y hojas en 0.5 mg.L<sup>-1</sup> C) formación de callos compacto crema en hipocótilo a 1.0 mg.L<sup>-1</sup> D) Callo friable en hoja a una concentración de 1.0 se observa fenolización mg.L<sup>-1</sup>. E) y F) Callo compacto color crema en hipocótilos y hojas se observa fenolización en hoja. Autor: Brenda Ivonne Vázquez Ramírez Laboratorio de *Cultivos vegetales ITTG*.

## 8. CONCLUSIÓN

- La mejor concentración para estimular un mayor porcentaje de germinación en semillas de *Bonellia macrocarpa* es de 2 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, ya que obtuvimos un 54% de germinación en semillas de *Bonellia macrocarpa*, sobre las otras concentraciones.
- En la inducción de respuestas morfogénicas el efecto que presentó el tratamiento con AIA (ácido indol acético) generó respuesta vía organogénesis indirecta obteniendo brotes en los explantes la mejor concentración que generó mayor respuesta fue la de 2.0 mg.L<sup>-1</sup>.
- El mejor tratamiento con BAP (6- bencil amino purina) fue a la concentración de 2.0mg.L<sup>-1</sup> se formaron mayor número de brotes en ambos explantes.
- El efecto que se obtuvo en el tratamiento con 2,4-D generó callos en todos los explantes y es la concentración óptima para obtener mayor masa de callo fué de 2.0 mg.L<sup>-1</sup>.

## **9. COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/ O APLICADAS**

La residencia profesional como estrategia educativa, me permitió como estudiante, aún estando en proceso de formación, incorporarme profesionalmente al trabajo laboral a través del desarrollo de este proyecto definido de trabajo profesional, conjugando simultáneamente el conocimiento de la ciencia y la tecnología, así como capacidad del intelecto y sensibilidad social.

Con este proyecto de residencia profesional, me vi enfrentado a situaciones como aprender el manejo de aparatos exclusivos del laboratorio de Cultivos Vegetales, durante el desarrollo del proyecto la manipulación de los explantes durante la resiembra o inducción, para evitar contaminación, la correcta desinfección de las semillas de la especie en la que se basó mi trabajo, etc. mismo que me impulsó a investigar por mi cuenta y con ayuda, motivación de mis asesores y compañeros de maestría, buscar explicaciones, resolver dudas y las problemáticas que el proyecto demandaba.

Además el desarrollo de la residencia profesional representa una forma de transitar entre la teoría y la práctica. El ámbito de trabajo, es una posibilidad para aplicar los conocimientos adquiridos durante la licenciatura que permite proponer soluciones a los problemas del tema en un campo profesional.

## 10.RECOMENDACIONES

- Para poder establecer un protocolo de micropropagación de *Bonellia macrocarpa* es importante realizar las etapas requeridas en el proceso de Micropropagación la cual como mencionamos anteriormente y al inicio, consta de cinco etapas.

En este trabajo únicamente se realizó las tres primeras etapas que fueron: 1) la Selección de material genético, en el caso de *Bonellia macrocarpa* por ser una planta endémica que se propaga por semillas utilizamos semillas para evaluar su germinación, hojas e hipocótilos para evaluar las respuestas morfogénicas en la etapa de multiplicación de brotes, 2) Desinfección de explantes, se estableció el protocolo de desinfección de las semillas de esta especie y 3) la multiplicación de brotes.

Para un mejor análisis es recomendable hacer un análisis del efecto de estas hormonas usándolas de manera combinada para evaluar el efecto en las respuestas morfogénicas de los explantes.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araya, E; Gómez, L; Hidalgo, N; Valverde, R. 2000. Efecto de la luz y del ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* de *Jaul* (*Alnus acuminata*). Agronomía Costarricense 24(1):75-80.

Bhattacharyya, K., Kar, T., Dutta, P.K., Achari, B. G., Rigid Bocellid, L., 2000. Oleana-12(13), 15(16)-dieno-3-diacetato diyl ,28. Acta Crystallogr. C 56, pp. 60-61.

Barba AA, Luna RBS, Romero AJ (2001) Micropropagación de plantas. Editorial Trillas. México.

Bourgau F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science 161: 839-851.

Caamal-Fuentes, E. Torres-Tapia, L.W., Sima'-Polanco, P. Peraza-Sánchez, S.R., Moo-Puc, R. 2011. Selección de plantas utilizadas en la medicina tradicional maya para tratar el cáncer síntomas similares. J. Ethnopharmacol. 135, 719-724.

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000) Natural products: secondary metabolites. En: Biochemistry and molecular biology of plants. BB Buchanan, W Grisseem, RL Jones (Eds). American Society of Plants Physiologists, Maryland USA. pp 1250-1318.

Fabri,A.G., Bartolini,G. & Lambardi,M. W. (2004). Propagation Manual. Landlinks Press. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=NvFrrquivIEC&pgis=1>

Floriani NV, Buffon ID, Cechinel FV (2006) Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. Química Nova 29: 549-554.

Fuentes, FV; Rodríguez, MN; Rodríguez, FC. 1996a. Acerca de la propagación de *Ocimum gratissimum* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 1(1):3-7.

Fuentes, FV; Rodríguez, MN; Rodríguez, FC. 1996b. Sobre la germinación de *Stephania rotunda* Lour. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 1(2):11-14.

García-Sosa, K., Sánchez-Medina, S.L., Álvarez, S., Zacchino, N.C., Veitch, P., Simá-Polanco, L.M., Peña\_Rodríguez, 2011. *Antifungal activity of sakurasosaponin from the root extract of Jacquinia Flamea*. *Natural Products Research* 25:1185-1189.

Lindsey K & Jones MGK (1989) *Plant Biotechnology in Agriculture*. Open University Press, Milton Keynes.

Loyola-Vargas V & Vazquez-Flota F (2006) An introduction to plant cell culture. En: *Plant cell culture protocols*. V Loyola-Vargas, F Vazquez-Flota (Eds). Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 3-8.

Murashige, T., & Skoog ., F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.

Neumann KH, Kumar A, Imani J (2009) *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

Osadao, R. 1834. "El Libro del Judío o medicina doméstica" Descripción de las virtudes de las yerbas medicinales de Yucatán. Notas adicionales del Dr. Andrew Heath de Zapata Mérida, Yucatán, México, pp. 20-255.

Pierik RLM (1990) *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Traducido al español por LA. Mateo-Sagasta. Mundi-Prensa, Madrid, España.

Piñol MT, Palazon J, Cusidó RM (2000) Introducción al metabolismo secundario. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal. J Azcón-Bieto, M Talón (Eds). McGraw Hill Interamericana, Barcelona, España. pp. 261-283.

Ramawat KG (2007) Secondary plant products in nature. En: Biotechnology: Secondary metabolites. KG Ramawat, JM Merillon (Eds). Science Publisher, Enfield, NH, USA. pp. 21-57.

Rodríguez, L., Sánchez, C., Romo, J., 1965. "Aislamiento y estructura del ácido jacquínico. Tetraedro 21, pp.1735-1750.

Rojas, R. Caviedes, L., Aponte, J.C., Vaisberg, A.J., Lewis, W.H., Lamas, G., et al., 2006. Aegicerin, la primera triterpeno oleanano con amplia actividad antimicobacteriana aislados de *Clavija procera*. J. Nat. prod. 69, 845-846.

Rout GR, Samantaray S, Das P (2000) *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnology Advances 18: 91-120.

Samuelsson G (2004) Drugs of natural origin: a textbook of pharmacognosy. Pharmaceutical Press, Stockholm.

Sánchez Medina, A., Peña Rodríguez, L.M., May-Pat, F. Karagianis, G., Waterman, P.G., Mallet, Al., et al., 2010. Identificación de sakurasosaponin como un principio citotóxico de *Jacquinia flammea*. Nat. Prod. Commun. 5, pp.365-368.

Smetanska I (2008) Production of secondary metabolites using plant cell cultures. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 111: 187-228.

Ståhl, B., Källersjö, M., 2004. Reintegro de *Bonellia* (Theophrastaceae). Novon 14, 115-118.

Taiz L & Zeiger E (2006) Plant physiology. Sinauer. USA. p. 441-446.

Valenzuela Cota D., Buitinea-Cantúa G., Rosas-Burgos E., Cinco –Marayoqui F. Yépiz Gómez M., Cortez Rocha M., Plascencia Jamotea, M., Burgos Hernandez A.. (2014). The Antifungal Effect Of Jacquinia Macrocarpa Plant Extracts On The Growth Of Aspergillus Flavus, A. Parasiticus And Fusarium Verticillioides. Revista Mexicana De Micologia, 39, 1-11.

<https://cienciacebas.wordpress.com/2013/03/06/embriogenesis-somatica-en-plantas/>