

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA**

**INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

**BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

**INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL**

**NOMBRE DEL PROYECTO:**

**“IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN CULTIVOS DE  
CALLOS DE POMARROSA (*Syzygium jambos*)”**

**QUE PRESENTA:**

**MARÍA DE LOS ANGELES AGUILAR DOMÍNGUEZ**

**N° DE CONTROL:**

**12270245**

**ASESOR:**

**DR. FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ MICELI**

**COASESOR:**

**M. C.GRECIA CITLALLI NAVARRO CRUZ**

# ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS .....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	I
ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS .....	II
RESUMEN .....	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 GENERALIDADES DE <i>Syzygium jambos</i> .....	2
2.1.1 DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA.....	2
2.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	2
2.1.3 CLIMA Y TEMPERATURA .....	5
2.1.4 SUELO Y PH.....	5
2.1.7 PROPAGACIÓN.....	5
2.1.8 TEMPORADA.....	6
2.1.9 ENFERMEDADES Y PLAGAS .....	6
2.2 USOS DE LA POMARROSA.....	7
2.2.1 ALIMENTICIO.....	7
2.2.2 OTROS USOS.....	8
2.2.3 MEDICINAL.....	8
2.3 ANTECEDENTES CIENTÍFICOS .....	8
2.4 METABOLITOS SECUNDARIOS .....	9
2.4.1 PRINCIPALES GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS ..	10
2.4.2 METABOLITOS REPORTADOS EN LA ESPECIE <i>Syzygium jambos</i> .....	14
2.5 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.....	14
2.5.2 MEDIOS DE CULTIVO DE CÉLULAS VEGETALES .....	15
2.5.3 COMPONENTES DEL MEDIO .....	15
2.5.4 REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL (RCV) .....	16
2.5.5 TIPOS DE CULTIVO .....	17
2.5.6 REGENERACIÓN DE PLANTAS .....	18
2.6 FENOLIZACIÓN DEL MEDIO.....	19

3. JUSTIFICACIÓN .....	20
4.OBJETIVOS .....	21
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	21
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
5. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA.....	22
6. METODOLOGÍA.....	23
6.1 COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL.....	23
6.2 MEDIO DE CULTIVO .....	24
6.3 PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO.....	24
6.4 DESINFECCIÓN DE SEMILLAS .....	25
6.5 GERMINACIÓN DE SEMILLAS.....	26
6.6 PROTOCOLOS DE DESINFECCIÓN PARA HOJAS SILVESTRES DE <i>Syzygium jambos</i> . .....	26
6.6.1 PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN 1, CAPTAN® Y AGRIMYCIN ® (P1).....	26
6.6.2 PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN 2, PENICILINA Y CLORURO DE MERCURIO (P2). .....	26
6.6.3 PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN 3, CLORURO DE MERCURIO (P3). .....	27
6.6.4 EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	27
6.6.5 SIEMBRA DE EXPLANTES.....	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	30
7.1 PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN PARA SEMILLAS. ....	30
7.2 RESPUESTAS EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS.....	32
7.3 RESULTADOS DEL EXPERIMENTO 1.....	32
7.4 RESULTADOS DEL EXPERIMENTO 2.....	34
8. CONCLUSIONES.....	36
9. PROBLEMAS A RESOLVER .....	37
10. ALCANCES Y LIMITACIONES.....	38
11. COMPETENCIAS DESARROLLADAS.....	39
12. RECOMENDACIONES.....	41
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Taxonomía de <i>Syzygium jambos</i> .....	2
<b>Cuadro 2.</b> Valor alimenticio por 100 g de fruto fresco.....	7
<b>Cuadro 3.</b> Diferencias entre metabolitos primarios y secundarios.....	9
<b>Cuadro 4.</b> Preparación de soluciones stock del medio MS.....	21
<b>Cuadro 5.</b> Medio de cultivo Murashige & Skoog, 1962.....	25
<b>Cuadro 6.</b> Fuente de Nitrato y Carbono.....	25
<b>Cuadro 7.</b> Reguladores de Crecimiento Vegetal.....	25

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resultados del protocolo de desinfección de semillas.....	30
<b>Tabla 2.</b> Resultados de los protocolos de desinfección.....	32
<b>Tabla 3.</b> Numero de frascos contaminados del experimento.....	35

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Porcentaje total de contaminación.....	30
<b>Gráfica 2.</b> Porcentaje de contaminación en los protocolos.....	33
<b>Gráfica 3.</b> Porcentaje de contaminación en el experimento.....	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Árbol joven de pomarrosa.....	2
<b>Figura 2.</b> Hojas de pomarrosa.....	3
<b>Figura 3.</b> Flor de pomarrosa.....	3
<b>Figura 4.</b> Frutos de pomarrosa.....	4
<b>Figura 5.</b> Semillas de pomarrosa.....	4
<b>Figura 6.</b> Enfermedades presentes en <i>S. jambos</i> .....	6
<b>Figura 7.</b> Síntesis de terpenos y su clasificación.....	10
<b>Figura 8.</b> Estructura química del fenol.....	11
<b>Figura 9.</b> Rutas de síntesis de compuestos fenólicos.....	11
<b>Figura 10.</b> Ruta del ácido shikímico.....	12
<b>Figura 11.</b> Estructura química de las saponinas.....	13
<b>Figura 12.</b> Estructura química de los alcaloides derivados de reticulina.....	13
<b>Figura 13.</b> Clasificación de callos.....	18
<b>Figura 14.</b> Embriogénesis A) Directa B) Indirecta.....	19
<b>Figura 15.</b> Organogénesis A) Directa B) indirecta.....	19
<b>Figura 16.</b> Mapa del municipio de Las Margaritas, Chiapas.....	23
<b>Figura 17.</b> Semillas de pomarrosa en inmersas en agua.....	23
<b>Figura 18.</b> Semillas después del proceso de desinfección.....	25
<b>Figura 19.</b> Semilla inoculada en el medio de cultivo MS.....	26
<b>Figura 20.</b> Aplicación de los protocolos de desinfección.....	27
<b>Figura 21.</b> Obtención de explantes.....	28
<b>Figura 22.</b> Explantes sembrados en medio de nutritivo MS.....	29
<b>Figura 23.</b> Cajas en la cámara bioclimática A) Luz, B) Oscuridad.....	29
<b>Figura 24.</b> Explantes de pomarrosa obtenidos el P2.....	29
<b>Figura 25.</b> A) Libre de contaminación B) Contaminación por hongo.....	31
<b>Figura 26.</b> A) Medio sin fenolización B) Medio sales totales, C) Medio ¼ de sales.....	31
<b>Figura 27.</b> A) Protocolo 1 y control en luz, B) Protocolo 2 y control en oscuridad Comparación del protocolo 2 y control.....	34
<b>Figura 28.</b> A) Protocolo 2 y control en luz, B) Protocolo y Control en oscuridad C) Comparación protocolo y control.....	34
<b>Figura 29.</b> A) Protocolo 3 y control en luz, B) Protocolo y Control en oscuridad C) Comparación del tratamiento T3 y control.....	34
<b>Figura 30.</b> Respuestas en la inducción de callos.....	36

## RESUMEN

*Syzygium jambos* es conocida comúnmente como pomarrosa o manzana rosa es una especie nativa del sur de Asia. Se desarrolla en climas tropicales, por lo que se ha introducido en diferentes partes del mundo, donde en su mayoría se consume el fruto fresco o en la elaboración de mermeladas, conservas y jarabes. Debido a su aroma, también es utilizado para elaborar fragancias (agua de rosas). En México el árbol se usa para dar sombra a sembradíos de café.

Sin embargo, no sólo se usa como alimento sino también en la medicina tradicional, por sus propiedades antiinflamatoria, antibacteriana, antidiabética, carminativa, diurética, analgésica, entre otras. Preparan infusiones de los diferentes órganos del árbol. De hecho, en Cuba usan la corteza para tratar la epilepsia.

Debido a estas propiedades se han realizado diversos estudios con extractos metanólicos de las hojas, corteza y raíces de *S. jambos*, donde se reportan compuestos con significativo valor farmacéutico. Contrario a esto, existe un único reporte donde usan el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) para la germinación *in vitro* de pomarrosa.

Por esta razón el proyecto fue realizado con la inquietud de responder a la pregunta: ¿en el cultivo de callos se encontrarán los mismos compuestos reportados en los extractos de la planta silvestre? Para esto, se decidió usar la Biotecnología como herramienta para el análisis de cultivo de callos a partir de hojas silvestres de *S. jambos*.

Para ello en el presente trabajo se estudió el establecimiento de protocolos de desinfección en explantes de hojas, inducción de cultivo de callos y analizar los metabólicos que dan a esta especie la actividad biológica, por medio de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Sin embargo, en el establecimiento del protocolo de desinfección, se presentaron problemas de contaminación por hongos y para combatirlo se emplearon tres procesos donde se usaron sustancias desinfectantes como penicilina, cloruro de mercurio, alcohol, AGRIMYCIN®, CAPTAN® e hipoclorito de sodio. Obteniendo explantes asépticos e inducir respuestas callogénicas con el regulador de crecimiento vegetal, 2,4-diclorofenoxiacético.

Los resultados obtenidos de este proyecto fueron sobre el protocolo de desinfección, puesto que fue un reto combatir la contaminación. Las evaluaciones de los tres protocolos en hojas apicales y basales arrojan que al usar hojas apicales pueden ser desinfectadas efectivamente. Así mismo se logró la inducción de respuestas callogénicas usando 2mg/L de 2,4 - D.

## INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia Myrtaceae se encuentra el género *Syzygium*, al cual pertenecen alrededor de 500 especies. *Syzygium jambos* es un árbol nativo del sudeste asiático y fue introducido al continente americano por los europeos en 1762. Se conoce comúnmente como pomarroza o manzana rosa, por el peculiar aroma a rosas de los frutos (Morales, 2006).

En esta especie hay estudios reportados de extractos metanólicos de hojas, corteza y raíces, donde se demuestra que contienen grupos de metabolitos como: alcaloides, flavonoides, taninos, triterpenos, entre otros (Hossain *et al.*, 2016). Debido a estos componentes, se determinaron diferentes actividades biológicas, tales como antioxidante, antifúngica, antibacteriana y antidiabética (Félix, 2002). Las cuales le dan a la planta un valor farmacéutico y para su estudio se usa a la Biotecnología como aliada.

Donde el cultivo tejidos vegetales se refiere al conjunto de técnicas usadas para el crecimiento de células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos. Se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Calva, 2005).

Dentro de las técnicas de CTV se encuentra el cultivo de callos donde el término "callo" se refiere al crecimiento masivo de células y a su acumulación. Las masas celulares desorganizadas se pueden producir a partir de una sola célula diferenciada, y las células callosas, tiene la capacidad de regenerar todo el cuerpo de la planta (Momokolkeuchi *et al.*, 2013).

Se ha encontrado un único reporte acerca de germinación *in vitro*, proliferación de brotes e inducción de callos a partir de plántulas asépticas de *S. jambos* (Prashanta *et al.*, 2003). Sin embargo, no existe estudio sobre la inducción de callos a partir de hojas silvestres de esta especie.

Por lo tanto en este trabajo para el CTV se han usado explantes silvestres de *S. jambos* y por lo general las plantas arbóreas, presentan algunos retos a superar, tales como contaminación, fenolización y la edad fisiológica de la planta los cuales influyen en el éxito de respuestas.

Por esta razón, este proyecto se llevó a cabo con el propósito de inducir callos a partir de explantes de hojas silvestres de *Syzygium jambos*, con el fin de analizar los compuestos bioactivos mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

## 2. MARCO TEÓRICO.

### 2.1 GENERALIDADES DE *Syzygium jambos*

El nombre científico de esta especie se deriva del griego “*syzygos*” refiriéndose a sus hojas opuestas, “*jambos*” proviene del nombre de un río al norte de la India. La pomarrosa o manzana rosa es un árbol de la familia Myrtaceae, originaria del sureste de Asia tropical, y esta especie ha sido introducida al continente americano por los ingleses en 1762.

#### 2.1.1 DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA

**Cuadro1.** Taxonomía de *Syzygium jambos* (Alston, 1931).

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Myrtales
Familia	Myrtaceae
Subfamilia	Myrtoideae
Tribu	Syzygieae
Género	<i>Syzygium</i>
Especie	<i>Syzygium jambos</i>

#### 2.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA (STREETS, 1962)

La pomarrosa es un árbol que alcanza de 10 a 16 m de altura, tiene una densa copa de ramas que son finas y se distribuyen de manera tortuosa, mientras que su tronco es delgado con una corteza lisa, de color castaño grisáceo (fig. 1).



**Figura 1.**Árbol joven de pomarrosa.  
**Fuente:** Mauro Guanandi.



Las hojas son alargadas, perennes, opuestas, lanceoladas o estrecho-elípticas, de 10-25 cm de largo y 2.5-6.25 cm de ancho, algo coriáceos, brillantes, de color verde oscuro y presentan nervaduras muy marcadas (fig. 2).



**Figura 2.** Hojas de pomarrosa.

**Fuente:** F. Areces.

Las flores son de color blanco cremoso o blanco verdoso, de 4 cm de largo, un cáliz de 4 lóbulos y 4 pétalos cóncavos. Generalmente, se presentan 4 o 5 flores juntas en racimos terminales (Fig. 3).



**Figura3.** Flor de pomarrosa.

**Fuente:** Jardin Mundani

Los frutos de la pomarrosa, aparecen 4 meses después de la floración. El fruto es casi redondo, oval o ligeramente en forma de pera, de 4-5 cm de largo, con una piel lisa, delgada, de color amarillo pálido o blanquecino, a veces de color rosa con tonos rojizos, que cubre una capa de pulpa crujiente, seca, amarillenta, dulce y el sabor se asemeja al olor de las rosas (Fig. 4).



**Figura 4.** Frutos de pomarrosa.  
**Fuente:** María del Carmen Hermida

En el centro hueco del fruto, la semillas son poliembriónicas contienen de 1 a 4 embriones, recubiertas por una capa áspera de color marrón, son duras, más o menos redondeadas y de 1-1.6 cm de espesor, que se aflojan de la pared interior y suenan cuando se agita la fruta (Fig. 5).



**Figura 5.** Semillas de pomarrosa.  
**Fuente:** María de los Angeles Aguilar Domínguez

### 2.1.3 CLIMA Y TEMPERATURA

La pomarrosa requiere un hábitat húmedo. Crece con mayor frecuencia al margen de las corrientes de agua, se vuelve más común a medida que la precipitación anual promedio sube más de 1700 mm. Con un clima sub-tropical húmedo. Pero también soporta un clima monzónico siempre que haya en el suelo una humedad adecuada en el tiempo de seca. Las temperaturas dentro del ambiente tropical no parecen ser de importancia crítica.

### 2.1.4 SUELO Y PH

Esta especie no es muy demandante en cuanto a sus requisitos de suelo a lo largo de las corrientes de agua. En las áreas elevadas, la especie requiere de un suelo fértil; crece muy lentamente en suelos erosionados y, por lo general, no se puede reproducir en suelos arenosos secos. *S. jambos* puede soportar suelos con un potencial hídrico (pH) igual o menor a 5. No se conoce el límite superior de tolerancia del pH.

### 2.1.7 PROPAGACIÓN (sabelotodo, 2016)

#### ❖ Propagación por germinación de semillas

Las semillas de la pomarrosa poseen un 50% de agua en su composición, éstas germinan cuando están recién caídas. A medida que van perdiendo la humedad, adquieren menos viabilidad para germinar. Dado que la mayoría de las semillas poseen varios embriones, los porcentajes de éxito de germinación de una son elevados. La viabilidad de las semillas almacenadas sin sellar a temperatura ambiente es menor de 1 mes. Sin embargo, un lote almacenado a una temperatura de entre 2 y 4 °C retuvo una viabilidad del 50 por ciento por 3 meses (Wadsworth, 1943).

En la India, la propagación vegetativa se ha realizado con el objetivo de normalizar el cultivo, para seleccionar y perpetuar los tipos enanos.

#### ❖ Propagación por enraizamiento de estacas, acodos e injertos.

Las estacas son partes del tallo, ramas sin hojas o raíz, se la pomarrosa que se toman de árboles donantes fuertes y sanos. Las estacas de madera dura no enraízan, incluso ni con factores de crecimiento químico y las estacas hechas con madera semidura tratada dio un 20% de éxito.

El acodo aéreo es una técnica de reproducción de árboles y arbustos mediante la cual se provoca la emisión de raíces en una rama para posteriormente cortarla y separarla de la planta madre, dando lugar a un nuevo árbol. En la pomarrosa los acodos aéreos hechos en la primavera y tratados con 1,000 ppm de ácido naftalenacético (ANA) dieron 60% de éxito. Los acodos aéreos no arraigan en la temporada de lluvias. En Bengala Occidental, los acodos se realizan con frecuencia en julio y se plantan en octubre y noviembre.

En experimentos con injertos de astilla y “T” se determinó que, se establecen. Los injertos cultivados aproximadamente en julio, en primavera con patrones de un año de edad fueron satisfactorios en el 31% de las plantas.

### 2.1.8 TEMPORADA

Los arboles de pomarrosa menores a 4 años de edad no fructifican y los mayores por lo general comienzan a fructificar después de 4 meses de la floración. En diferentes países las fechas de floración varían según el clima y la humedad del área vegetativa. En la parte central de México, la floración se produce en febrero, marzo y abril y los frutos maduran de junio a julio. A diferencia del tiempo de floración en el lugar de origen de la pomarrosa en la India comienza en enero y el fructificación es en mayo.

### 2.1.9 ENFERMEDADES Y PLAGAS

La pomarrosa tiene pocos insectos enemigos. En los climas húmedos, las hojas a menudo se recubren con fumagina, la cual es una patología de las plantas producida por el desarrollo de un hongo saprófito, que crece en la excretada por los pulgones.

También es propensa a la mancha foliar causada por *Cercospora* sp., *Gloeosporium* sp. y *Phyllosticta eugeniae*; las manchas en las hojas por las algas (*Cephaleuros virescens*); mancha negra de la hoja (*Asterinella puiggarii*) y la antracnosis (*Glomerella cingulata*). La pudrición de la raíz causada por *Fusarium* sp. Y las setas que pudren la raíz (*Armillaria tabescens*) atacan el árbol (Esquivel, 2008).

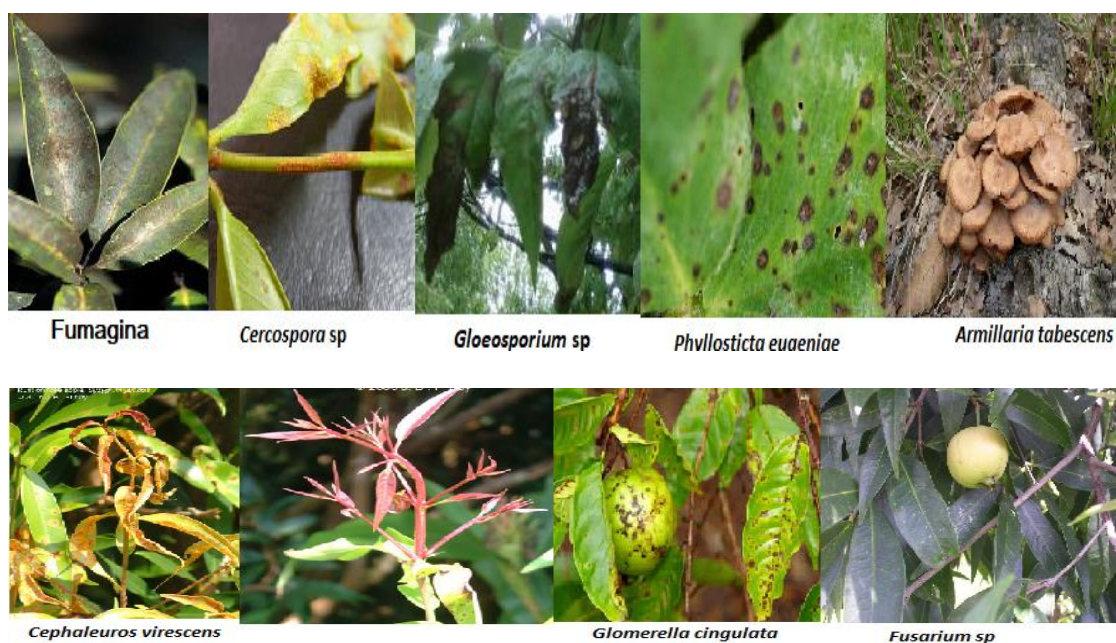


Figura 6. Enfermedades presentes en *S. jambos*.

## 2.2 USOS DE LA POMARROSA.

### 2.2.1 ALIMENTICIO

El fruto de la pomarrosa se consume, en su mayor parte, fresco, en ensaladas de frutas, conservas, mermelada o jalea, También se hace como sirope para su uso como salsa o para dar sabor a bebidas frías. Se cortan a la mitad o en rodajas y se confitan. En el cuadro 2 se reporta el valor nutrimental por 100 g de fruto fresco.

Se ha comprobado que la miel producto de abejas que liban en flores de pomarrosa, es de un sabor y una textura muy agradable. Sin embargo su explotación comercial es limitada debido a que la juventud de los árboles jóvenes dura 4 años y después de estos comienza a fructificar por temporada.

**Cuadro 2.** Valor alimenticio por 100 g de fruto fresco.

Calorías	56
Humedad	84.5-89.1 g
Proteína	0.5-0.7 g
Grasa	0.2-0.3 g
Carbohidratos	14.2 g
Fibra	1.1-1.9 g
Ceniza	0.4-0.44 g
Calcio	29-45.2 mg
Magnesio	4 mg
Fósforo	11.7-30 mg
Hierro	0.45-1.2 mg
Sodio	34.1 mg
Potasio	50 mg
Cobre	0.01 mg
Azufre	13 mg
Cloro	4 mg
Caroteno	123-235 I.U.
Tiamina	0.01-0.19 mg
Riboflamina	0.028-0.05 mg
Niacina	0.521-0.8 mg
Ácido ascórbico	3-37 mg

Análisis hechos en América central y otros lugares (Sabelotodo, 2016)

## 2.2.2 OTROS USOS (Sabelotodo, 2016).

En Bengala 1849 comenzaron a usar los frutos maduros, sin semillas, para destilados 4 veces y hacer "agua de rosas", igual a las mejores obtenidas a partir de los pétalos de la rosa. También han logrado extraer un aceite esencial de color amarillo, destilado a partir de las hojas, que contiene 26.84% *dl*- $\alpha$ -pineno y 23.84% *l*-limoneno y puede ser utilizado para su uso en la industria del perfume.

Por otra parte, la madera obtenida de los árboles de pomarroza es usada para elaborar muebles, marcos para instrumentos musicales entre otros. Sin embargo no es duradera y es propensa al ataque de las termitas. Las ramas son muy flexibles y se usan para tejer cestas grandes. El árbol vuelve a crecer rápidamente después del corte por el tronco y, en consecuencia produce un suministro continuo de madera pequeña para combustible.

## 2.2.3 MEDICINAL

En la India, la fruta es considerada como un tónico para el cerebro y el hígado. Una infusión actúa como diurético.

En diferentes países del mundo los órganos del árbol de pomarroza es usado para tratar diferentes malestares, en su mayoría se consumen en infusiones, por ejemplo:

Una preparación azucarada de las flores disminuye la fiebre, en Nicaragua tuestan las semillas y las trituran para preparar una bebida de estas y ayuda a controlar la diabetes, en Colombia estas tienen propiedades anestésicas también se emplean contra la diarrea, la disentería y el catarro.

La decocción de las hojas se aplica a los ojos irritados, también sirve como diurético, expectorante y para el tratamiento del reumatismo. El jugo de la maceración de las hojas se toma como febrífugo. Las hojas en polvo se han usado en los cuerpos de los pacientes de viruela con efecto refrescante.

La corteza contiene entre 7 – 12.4% de tanino, por lo cual es usada para estimular el vómito y como laxante. La decocción también se administra para aliviar el asma, la bronquitis y la ronquera.

Por último la raíz es usada en Cuba como remedio eficaz contra la epilepsia.

## 2.3 ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

En diferentes reportes de artículos científicos se han encontrado compuestos que dan a la planta de *Syzygium jambos* propiedades tal como antiinflamatoria, antibacteriana, antioxidante, antiviral, anticancerígeno, antidiabética, y antifúngica.

En el aislamiento con etanol del extracto de hojas de *Syzygium jambos* se encontraron compuestos como el escualeno, un análogo del ácido anácido y ácido ursólico que se informan por primera vez. El ácido anácido fue capaz de inhibir el crecimiento de *Propionibacterium acnes* (Sharma, 2013).

Se han encontrado agentes antioxidantes miricitrin, miricitrina, miricetina y ácido gálico, en el extracto. Las longitudes de onda usadas para la espectrofotometría del extracto son las siguientes: 271nm para el ácido gálico, 325nm para el ácido cafeico y ácidos cloro-génicos y 365nm para quercetina, rutina y kaempferol.

## 2.4 METABOLITOS SECUNDARIOS

El metabolismo es el conjunto de procesos y reacciones químicas anabólicas y catabólicas; por los cuales un microorganismo obtiene la energía y los nutrientes que necesita para vivir y reproducirse. Los microorganismos utilizan estrategias metabólicas distintas y las especies pueden a menudo distinguirse en base a estas estrategias. Las características metabólicas específicas de un microorganismo constituyen el principal criterio para determinar su papel ecológico, su responsabilidad en los ciclos biogeoquímicos y su utilidad en los procesos industriales.

Existen dos tipos fundamentales de metabolismo: El metabolismo primario, que se considera esencial para la vida y es común a todos los seres vivos y el metabolismo secundario, que se considera no-esencial para la vida y se produce en bacterias, algas, hongos, animales y vegetales.

En los vegetales el metabolismo secundario es muy importante puesto que da lugar a productos (denominados metabolitos secundarios) que resultan de sumo interés desde el punto de vista farmacológico. La mayoría de los principios activos que se obtienen de las plantas medicinales proceden del metabolismo secundario. (Pérez, 2006)

Las plantas sintetizan y acumulan diferentes sustancias como el ADN, ARN, proteínas, polisacáridos, azúcares y lípidos a partir de nutrimentos inorgánicos. Las sustancias vegetales, presentan propiedades también muy diversas, aunque su papel fisiológico en la planta es muchas veces desconocido (Avalos, 2009).

En el cuadro 3 se describen las diferencias entre los metabolitos primarios y secundarios.

**Cuadro 3.** Diferencias entre metabolitos primarios y secundarios

Metabolitos primarios	Metabolitos secundarios
Productos del metabolismo general. Ampliamente producidos en plantas y microorganismos. Indispensables para la vida. Aminoácidos, monosacáridos, lípidos, ácidos derivados del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, glucósidos, etc.	Productos del metabolismo especial. Biosintetizados a partir del metabolismo primario. Distribución restringida a ciertas plantas, microorganismos. No indispensables para la vida. Alcaloides, terpenos, flavonoides, esteroides, Cumarinas, etc.

Además de su participación en los procesos señalados, la importancia de los metabolitos secundarios es evidente si se toma en cuenta su amplia distribución y gran diversidad. Verpoorte, 2000 señala que aproximadamente 85 000

metabolitos secundarios han sido identificados en plantas y aproximadamente cada año se detectan cerca de 4 000.

## 2.4.1 PRINCIPALES GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS (AVALOS, 2009).

### TERPENOS

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40,000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas.

Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C) (Fig.7). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C<sub>5</sub>) que contienen (Fig. 7).

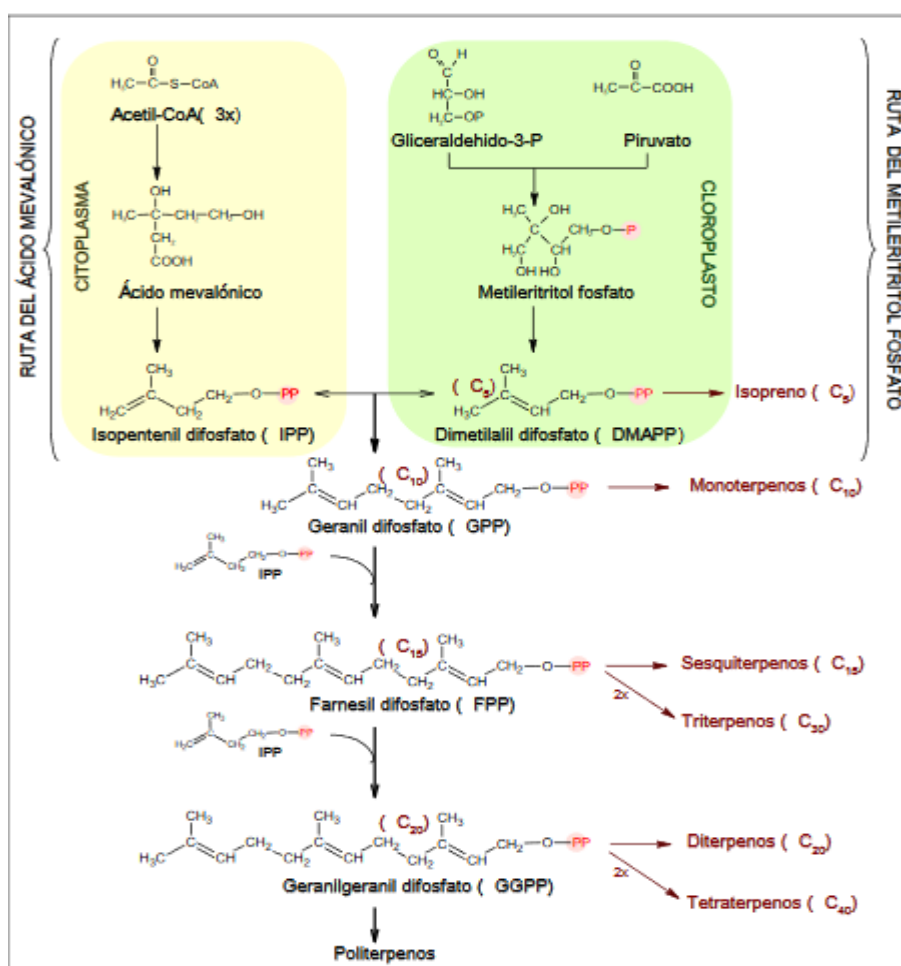


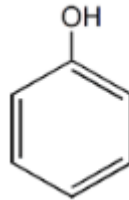
Figura 7. Síntesis de terpenos y su clasificación (Avalos, 2009).

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalaricales, antimicrobianas, etc.



## COMPUESTOS FENÓLICOS

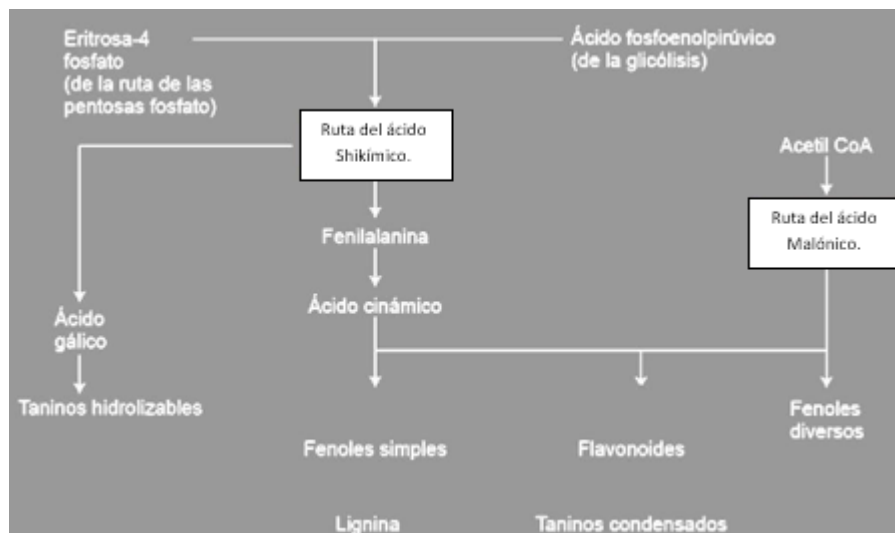
Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Fig.8).



**Figura 8.** Estructura química del fenol (Avalos, 2009).

Son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides.

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico (Fig. 9).



**Figura 9.** Rutas de síntesis de compuestos fenólicos (modificado de Avalos, 2009).

La ruta del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores.

La ruta del ácido shikímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. A partir de eritrosa-4-fosfato y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido shikímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la

fenilalanina. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales (Fig. 10).

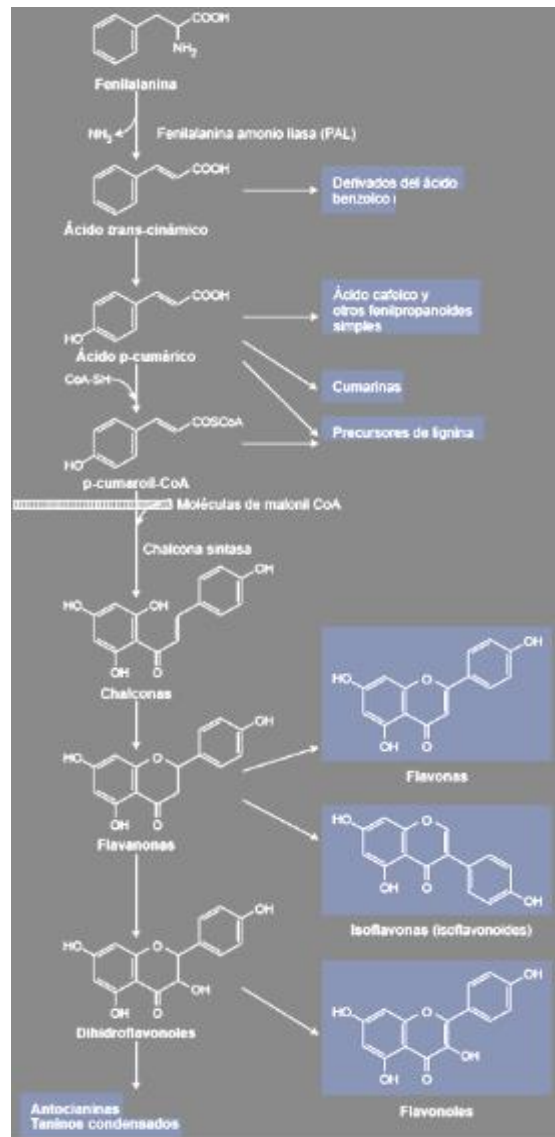
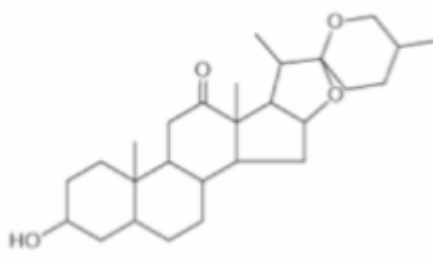


Figura 10. Ruta del ácido shikímico (avalos, 2009).

## GLUCÓSIDOS

Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos (Fig. 11). Una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos.



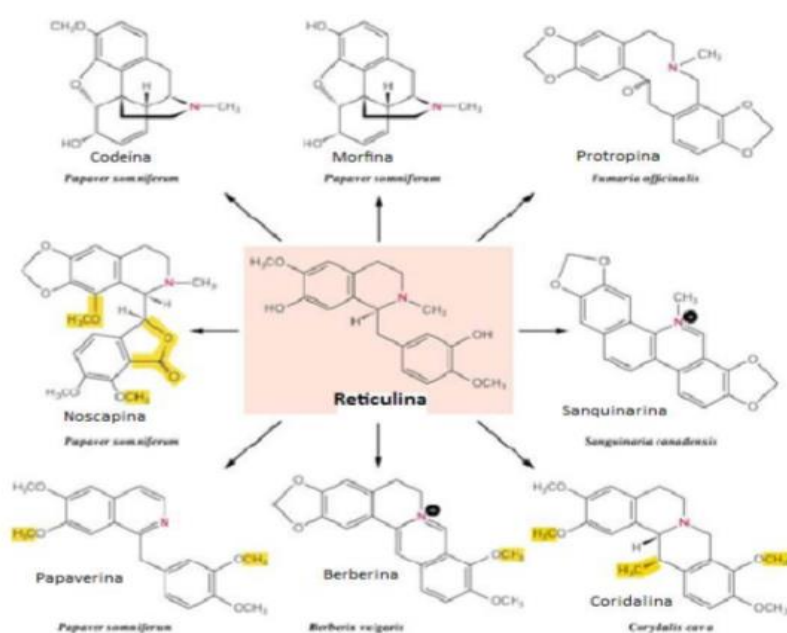
**Figura 11.** Estructura química de las saponinas (Avalos, 2009).

## ALCALOIDES

Los alcaloides son una gran familia de más de 15,000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina, por ejemplo. Se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas.

Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina.

El opio es quizá uno de los primeros alcaloides conocidos, el exudado (látex) de la cápsula inmadura de *Papaver somniferum*. Este exudado contiene una mezcla de más de 20 alcaloides diferentes entre los que se encuentran la morfina y la codeína. Ambos alcaloides pertenecen a un grupo denominado alcaloides isoquinolínicos que sintetizan a partir de la reticulina (Fig. 12).



**Figura 12.** Estructura química de los alcaloides derivados de reticulina (Avalos, 2009).

## **2.4.2 METABOLITOS REPORTADOS EN LA ESPECIE *Syzygium jambos* (HOSSAIN *et al.*, 2016).**

Se cuantificaron altos niveles de hidrato de catequina e hidrato de rutina (99.00 y 79.20 mg / 100 g de extracto, respectivamente) y cantidades moderadas de ácido elágico y quercetina (59.40 y 69.30 mg / 100 g de extracto, respectivamente). El hidrato de catequina de este extracto de planta se determinó por primera vez mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para el ensayo de barrido ABTS es un radical libre que se oxida y da tiene una coloración azul – turquesa que se mide por absorbancia, el valor de la concentración de inhibición de la mediana (IC50) de *S. jambos* fue de 57,80 µg / ml, que fue significativo del ácido ascórbico (12,01 µg / ml).

Se encontró que la absorbancia máxima para el ensayo de potencia de reducción era 0,4934. La capacidad antioxidante total, los contenidos fenólicos y flavonoides se calcularon en 628,50 mg / g de ácido ascórbico, 230,82 mg / g de ácido gálico y 11,84 mg / g de quercetina equivalente, respectivamente.

A una dosis de 400 mg / kg, se observó una actividad antiinflamatoria aguda significativa ( $p < 0.01$ ) en ratas para ambos modelos de prueba con una reducción en el volumen de la plata de 58.04 y 53.95%, en comparación con los de la indometacina (62.94 y 65.79%), respectivamente.

## **2.5 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.**

### **2.5.1 El cultivo de tejidos vegetales (CTV)**

Se refiere al conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos. Se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Calva, 2005)

El CTV fue desarrollado a partir de la investigación de botánicos y fisiólogos vegetales desde 1950. Actualmente se ha convertido en una herramienta internacional importante en la biotecnología.

El origen de CTV se debe a la investigación sobre hormonas que controlan el crecimiento y desarrollo vegetal. Este conocimiento se combinó con las técnicas básicas de microbiología por las cuales microorganismos se hacen crecer en medios estériles para su producción e identificación. Desde estas dos fuentes provino la tecnología por la cual las plantas u órganos de plantas se pueden multiplicar en gran número, o su crecimiento individual controlado, haciendo crecer pequeños trozos de tejido vegetal llamados explantes sobre una formulación precisa de nutrientes en un recipiente estéril (Morgan, 2009).

Dentro del cultivo las células vegetales tienen necesidades, químicas y físicas, que deben ser satisfechas por el medio de crecimiento y el ambiente externo (luz, temperatura, etc.). El medio nutritivo debe proveer todos los iones minerales esenciales necesarios para el crecimiento y el desarrollo. En algunos casos también debe proveer suplementos orgánicos adicionales, como aminoácidos y vitaminas.

Muchos de los cultivos de células vegetales necesitan la adición de una fuente permanente de carbono en forma de azúcar comúnmente sacarosa, ya que esas células son fotosintéticas. Otro componente vital que debe ser provisto es el agua, el solvente biológico principal. Factores físicos como la temperatura, el pH, el ambiente gaseoso, la duración y cantidad de luz y la presión osmótica también deben mantenerse dentro de rangos aceptables.

### **2.5.2 MEDIOS DE CULTIVO DE CÉLULAS VEGETALES (Slater *et al.*, 2008)**

Los medios utilizados para el cultivo *in vitro* de células vegetales están conformados por tres componentes básicos:

1. Elementos esenciales (iones minerales) provistos como una mezcla de sales.
2. Un suplemento orgánico que brinde vitaminas y/o aminoácidos.
3. Una fuente permanente de carbono, usualmente sacarosa.

Para propósitos prácticos, los elementos esenciales se subdividen en las siguientes categorías:

1. Macroelementos o macronutrientes.
2. Microelementos o micronutrientes.
3. Una fuente de hierro.

### **2.5.3 COMPONENTES DEL MEDIO**

#### Macroelementos

Esta solución stock provee los elementos que la planta requiere en grandes cantidades para su crecimiento y desarrollo. El nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio y azufre (y carbono, que se agrega por separado) son comúnmente considerados como macroelementos.

#### Microelementos

Estos elementos se requieren en pequeñas cantidades para el crecimiento y desarrollo de la planta y juegan muchos y diferentes papeles. El manganeso, yodo, cobre, cobalto, boro, molibdeno, hierro y zinc comúnmente conforman los microelementos, aunque en otras fórmulas se incluyen otros elementos como el níquel y el aluminio.

#### Suplementos orgánicos

Solamente dos vitaminas, tiamina (vitamina B1) y mioinositol (considerada como una vitamina B) son consideradas esenciales para el CTV.

Algunos aminoácidos también se agregan comúnmente al suplemento orgánico. El utilizado más frecuentemente es glicina, pero en muchos casos su inclusión no es esencial. También se utilizan la arginina, asparagina, ácido aspártico, alanina, ácido glutámico, glutamina y prolina.

Fuente de carbono

La sacarosa amplia disponibilidad, es asimilada con facilidad y es relativamente estable, por lo que es la fuente de carbono más utilizada. Otros carbohidratos como la glucosa, maltosa, galactosa y sorbitol también pueden utilizarse, y en algunas circunstancias especiales pueden ser superiores a la sacarosa.

Agentes gelificantes

El medio para el cultivo de células vegetales puede ser utilizado en forma líquida o sólida, dependiendo del tipo de cultivo. Para muchos tipos de cultivos que requieren que las células o tejidos vegetales crezcan en la superficie del medio, este debe ser gelificado. Para esto se utiliza comúnmente PHYTAGEL®.

#### **2.5.4 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.

Existen cinco grupos principales de reguladores de crecimiento utilizados en el cultivo de células vegetales.

1. Auxinas: promueven la división y el crecimiento celular.

Auxinas naturales:

- Ácido indolacético (AIA)
- Ácido cloroindol-3-acético (CI-IAA)

Auxinas sintéticas:

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

2. Citocininas: promueven la división celular.

- Cinetina
- Zeatina
- Benciladenina (BA)
- 6 – Bencilaminopurina (6BAP)

Las auxinas y citoquininas son los reguladores de crecimiento utilizados más frecuentemente y son utilizados en conjunto; la relación de auxina a citocinina determina el tipo de cultivo establecido o regenerado.

3. Giberélinas: están involucradas en el alargamiento celular y son importantes agrónomicamente al determinar la altura de la planta y el inicio del desarrollo y maduración de los frutos.

- Ácido Giberélico (GA<sub>3</sub>)

4. Ácido abscísico (ABA): inhibe la división celular y es utilizado frecuentemente en cultivo de tejidos vegetales para promover diferentes rutas de desarrollo, como la embriogénesis somática.

5. Etileno: este es un regulador comúnmente asociado con el control de la maduración de los frutos. Algunos cultivos producen etileno; si este se acumula puede llegar a inhibir el crecimiento y desarrollo del cultivo.

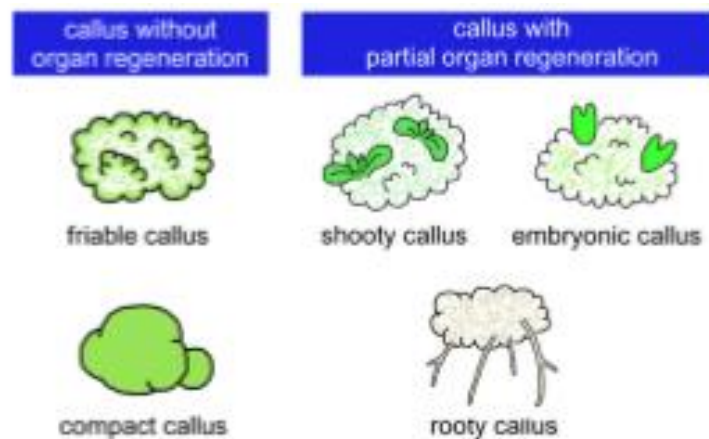
### 2.5.5 TIPOS DE CULTIVO

Los cultivos son iniciados, generalmente, a partir de partes estériles de una planta completa. Estas partes se denominan “explantes” y pueden ser partes de órganos, como hojas, tallos o raíces. Las características del explante afectan la eficiencia de las respuestas. Generalmente un tejido joven que se encuentre en un estado temprano de desarrollo es más efectivo (Slater *et al.*, 2008).

#### Callos

Las masas celulares desorganizadas se denominan colectivamente callo. Los callos pueden producirse a partir de una sola célula diferenciada, y muchas células callosas son totipotentes, pudiendo regenerar todo el cuerpo de la planta. (Momokolkeuchi *et al.*, 2013). El cultivo se inicia con una relación igual de auxina y citoquinina.

Se pueden clasificar en subgrupos en función de sus características macroscópicas. Por ejemplo, los callos sin regeneración de órgano aparente generalmente se llaman callo friable o compacto (Fig. 13). Otros callos que muestran algunos grados de regeneración de órganos se denominan callos organogénicos o embriogénicos (Momokolkeuchi *et al.*, 2013).



**Figura 13.** Clasificación de callos.

### Suspensiones celulares

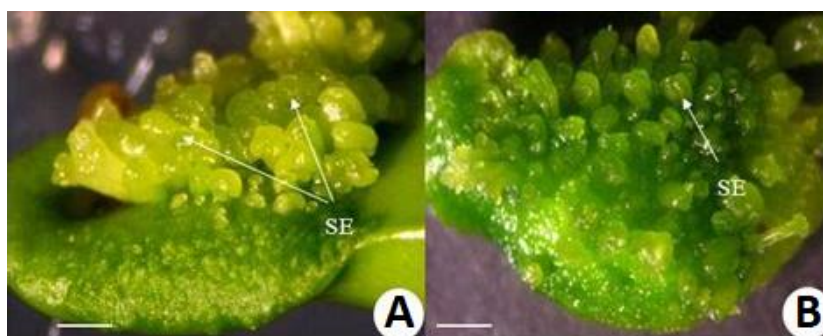
Los callos pueden ser de dos tipos, compactos y friables. Los compactos tienen las células empaquetadas de forma muy densa, mientras que los friables las tienen asociadas débilmente. Los callos friables se pueden colocar en el medio en el que se cultivaron, líquido, para dar origen a una suspensión de células, pues al colocarlo allí grupos de células se desprenden (Slater *et al.*, 2008).

### 2.5.6 REGENERACIÓN DE PLANTAS

Existen dos métodos para la regeneración de plantas que son utilizados ampliamente: la embriogénesis somática y la organogénesis.

#### Embriogénesis somática

En este tipo de cultivo las estructuras similares a embriones se desarrollan en plantas completas, en forma análoga a como lo hacen los cigotos normales. Estas estructuras están formadas a partir de tejidos somáticos directa o indirectamente. En la embriogénesis directa, el embrión se forma directamente a partir de una célula o un fragmento tejido vegetal, a diferencia de la indirecta donde se produce un callo a partir del explante (Fig. 14).



**Figura 14.** Embriogénesis A) Directa B) Indirecta



## Organogénesis

La organogénesis consiste en la producción de órganos, ya sea directamente a partir de un explante o indirectamente a partir de un callo (Fig. 15).



**Figura 15.** Organogénesis A) Directa B) indirecta

## 2.6 FENOLIZACIÓN DEL MEDIO

Es debido a la presencia de la polifenoloxidasas (enzimas), es decir que los polifenoles son producidos por las vacuolas y se mezclan con los plastidos. Esto produce oscurecimiento del explante.

La oxidación se puede controlar con agentes antioxidantes tales como: Ácido cítrico (AC), Carbón activado (CA), L-cisteína (LC), Polivinilpirrolidona, 4-hexilresorcinol (PVP), N-acetilcisteína (AC), ácido ascórbico (AA), ácido isoascórbico (AIA), sorbato de potasio (SP).

### 3. JUSTIFICACIÓN

*Syzygium jambos* es un árbol originario de la India, poco estudiado en México. Diferentes estudios científicos han evaluado extractos de hojas, corteza y raíces, reportando la presencia compuestos con actividad biológica que dan a la planta propiedades medicinales. Se utiliza para controlar distintos malestares como disentería, dolor de cabeza, fiebre, problemas respiratorios y diabetes, entre otros.

Por esta razón, se pretende que al inducir un cultivo de callos se puedan encontrar metabolitos, como terpenos y fenoles, que confieren a esta especie las propiedades antes mencionadas. Sin embargo, no existen reportes de inducción de callos a partir de hojas de pomarrosa por lo que será un reto.

Con este proyecto se podrá adquirir mayor conocimiento aplicable, puesto que al identificar estos metabolitos podrían en un futuro ser usados en la farmacéutica.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Inducir callos a partir de explantes silvestres de *Syzygium jambos*, con el fin de analizar la obtención de compuestos bioactivos, con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar un protocolo de desinfección eficiente para hojas silvestres de *Syzygium jambos*.
- Establecer tratamientos como pre-enjuagues para disminuir la oxidación en los explantes de pomarroja.
- Evaluar el efecto de tratamientos con diferentes concentraciones de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) para la inducción de callos.

## 5. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA

El Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) se encuentra en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG) ubicado en la Carretera Panamericana Km 1080, CP. 29050, Chiapas.

El laboratorio de CTV se encuentra dividido en tres espacios:

La sala central donde se encuentran los aparatos de uso general para la preparación de medios de cultivo como: materiales de vidrio, reactivos, autoclave, balanzas, agitadores magnéticos, etc.

Cuarto de esterilidad donde se encuentran dos campanas de flujo laminar.

Cámara bioclimática acondicionada para el cultivo, con temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  y fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL

La colecta de las semillas se realizó el día 30 de junio de 2017, en localidades pertenecientes al municipio de Las Margaritas, Chiapas con las siguientes coordenadas latitud 16.3153, longitud -91.9817 16° 18'55" Norte, 91° 58' 54" Oeste (Fig. 16). San Isidro, Santa Rosa y Vicente Guerrero que se localizan a la altitud de 1089, 1118, 1059 msnm, respectivamente. (Pueblos. America.com, 1999)



**Figura 16.** Mapa del municipio de Las Margaritas, Chiapas.  
Fuente: Googlemaps.

Observaciones personales.

Durante el tiempo que se realizó la colecta de frutos en las localidades del municipio de las Margaritas, Chiapas. Se entrevistaron a grupos de habitantes para saber los periodos de fructificación de la pomarroza y los resultados arrojaron que es en diferentes meses del año, según el clima, suelo, geografía y demografía. Pues en las comunidades aledañas al centro de la ciudad hay mayor vegetación puesto que hay menor población de personas.

Después de la colecta las semillas fueron llevadas al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del (ITTG) (Fig. 17).



**Figura 17.** Semillas de pomarroza en inmersas en agua.

## 6.2 MEDIO DE CULTIVO

El medio utilizado fue Murashige & Skoog, 1962 (MS), el cual se preparó con soluciones concentradas las cuales se encontraban constituidas de la siguiente manera (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Preparación de soluciones stock del medio MS

Solución	Concentración 1000X50MI	Cantidad
A	Cloruro de calcio CaCl <sub>2</sub>	22.00g
B	Yoduro de potasio KI Cloruro de cobalto CoCl <sub>2</sub>	41.50mg 1.25mg
C	Fosfato monobásico de potasio KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Ac. Bórico H <sub>2</sub> Bo Molibdato de sodio NaMoO <sub>4</sub>	3.400g 0.124g 0.005g
D	Sulfato de magnesio MgSO <sub>4</sub> Sulfato de manganeso MNSO <sub>4</sub> Sulfato de Zinc ZnSO <sub>4</sub> Sulfato de cobre CuSO <sub>4</sub>	7.400g 0.340g 0.172g 0.500mg
E	Sulfato ferroso FeSO <sub>4</sub> EDTA disódico Na <sub>2</sub> EDTA	0.557g 0.745g
F	Glicina Piridoxina Ácido nicotínico Tiamina HCl Mio Inositol	20.0mg 5.00mg 5.00mg 1.00mg 1.00g

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 DE CULTIVO

Se preparó el medio MS con soluciones stock (cuadro 5), fuente de Nitrato y Carbono (cuadro 6), se adicionado con RCV (cuadro 7), el pH se ajustó a una concentración de 5.7, se agregó como agente solidificante 2.5 g/L de PHYTAGEL® y se procedió a esterilizar en autoclave a 15 libras de presión por pulgada cuadrada (15lb/in<sup>2</sup>) a una temperatura de vapor aproximada de 121.5°C, durante 18 minutos.

**Cuadro 5.** Medio de cultivo Murashige &Skoog, 1962 (MS)

Soluciones	1000mL
A	1.0mL
B	1.0mL
C	2.5mL
D	2.5mL
E	5.0mL
F	10mL

**Cuadro 6.** Fuente de Nitrato y Carbono

Compuesto	Cantidad en g/L.
NITRATO DE POTASIO	1.9
NITRATO DE AMONIO	1.6
SACAROSA	30

**Cuadro 7.** Reguladores de Crecimiento Vegetal

Respuesta	Regulador	Cantidad (mg.L <sup>-1</sup> )
Germinación	GA <sub>3</sub>	2
Inducción de callos	2,4-D	2

## 6.4 DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

Las semillas fueron desinfectadas usando el procedimiento de Prashanta, 2003. Se hidrataron previamente durante 24 horas. Posteriormente dentro de la campana de flujo lamina se sumergieron en una solución de alcohol etílico al 80% durante 10 s, en seguida fueron inmersas en una solución de hipoclorito de sodio (CLORALEX®) al 2.5% durante 10 min. Las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril (Fig. 18).



**Figura 18.** Semillas después del proceso de desinfección.

## 6.5 GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Después de haber realizado el protocolo de desinfección las semillas fueron sembradas en frascos GERBER® con medio nutritivo MS¼ de sales adicionado con 2mg/L de GA3 (Fig.19). Los frascos inoculados se llevaron a la cámara bioclimática en condiciones de oscuridad y una temperatura de 25°C ±1.

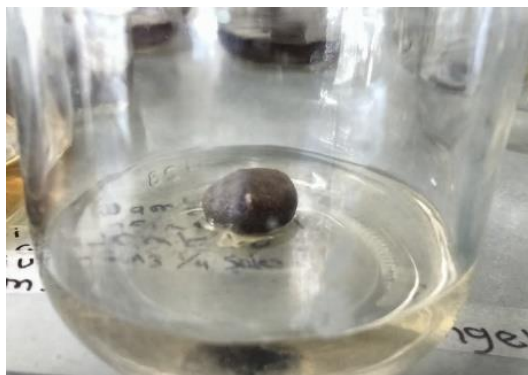


Figura 19. Semilla inoculada en el medio de cultivo MS.

## 6.6 PROTOCOLOS DE DESINFECCIÓN PARA HOJAS SILVESTRES DE *Syzygium jambos*.

### 6.6.1 PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN 1, CAPTAN® Y AGRIMYCIN® (P1).

Las hojas se lavaron con agua de grifo y jabón comercial AXION®, posteriormente se enjuagaron 3 veces. Se sumergieron en una solución 2.5g/L de CAPTAN® y AGRIMYCIN® durante media hora. Seguido de tres enjuagues con agua destilada.

El material vegetal se llevó a la campana de flujo laminar para continuar el proceso de desinfección en condiciones de asepsia.

Las hojas fueron inmersas en una solución de CLORALEX® al 25% durante 10 minutos, después se lavaron con agua destilada estéril y se transfirieron a una solución de alcohol al 70% durante 3 minutos. Posteriormente se enjuagaron con agua estéril.

### 6.6.2 PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN 2, PENICILINA Y CLORURO DE MERCURIO (P2).

Las hojas fueron lavadas varias veces con agua corriente para eliminar partículas de polvo.

Se lavaron con detergente líquido AXION® durante 5 minutos y nuevamente se lavaron con agua corriente para eliminar rastros de jabón.



Los explantes se sometieron a una solución de penicilina al 0.2% durante 15 minutos, se enjuagaron 3 veces dentro de la campana de flujo laminar con agua destilada estéril.

Posteriormente se sumergieron en una solución de cloruro de Mercurio al 2% durante 10 minutos, después se lavaron tres veces con agua estéril para eliminar las huellas de cloruro de mercurio.

Seguido de alcohol etílico al 70% durante un minuto y después se enjuagaron con agua estéril.

### **6.6.3 PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN 3, CLORURO DE MERCURIO (P3).**

Este protocolo realizo siguiendo los pasos del protocolo 2 con la diferencia que en este no se usa la solución de penicilina.

### **6.6.4 EXPERIMENTOS REALIZADOS.**

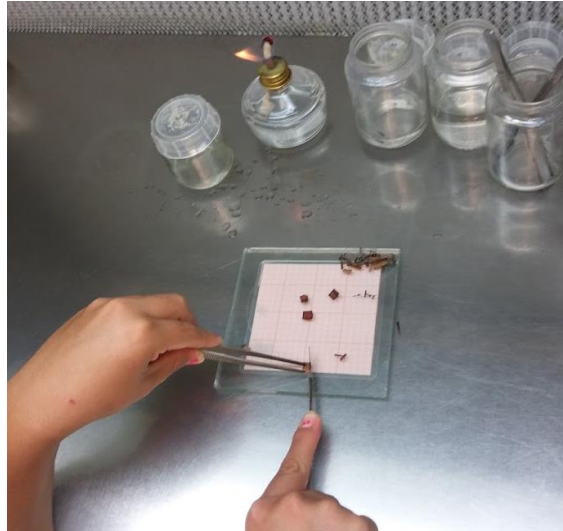
El primer experimento se hizo aplicando los tres protocolos y un control donde los explantes se lavaron únicamente con agua y jabón. Este procedimiento se aplicó en hojas apicales y basales, los explantes fueron cultivados en cajas Petri con medio MS a  $\frac{1}{4}$  de sales para reducir la oxidación por fenoles en el medio (Fig. 20) se ilustra el procedimiento.



**Figura 20.** Aplicación de los protocolos de desinfección.

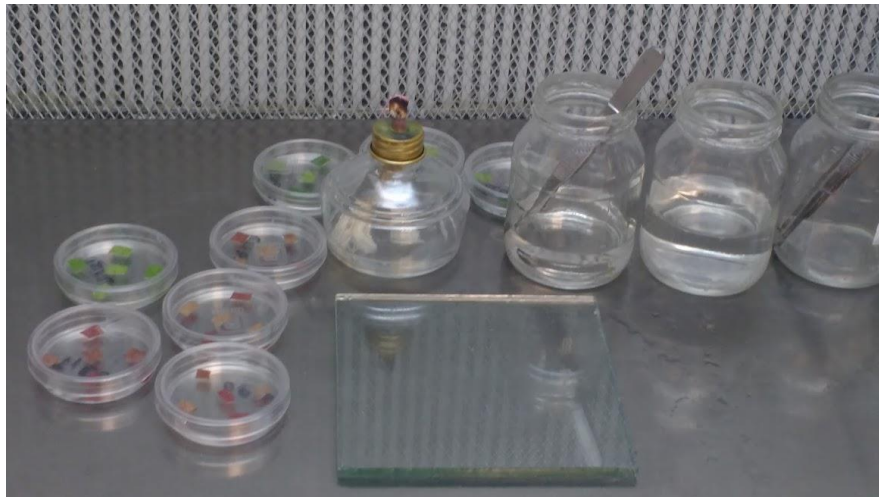
### 6.6.5 SIEMBRA DE EXPLANTES

Seguido del protocolo de desinfección, se procedió a cortar las hojas de *Syzygium jambos* para obtener explantes de 1 cm<sup>2</sup> (Fig.21).

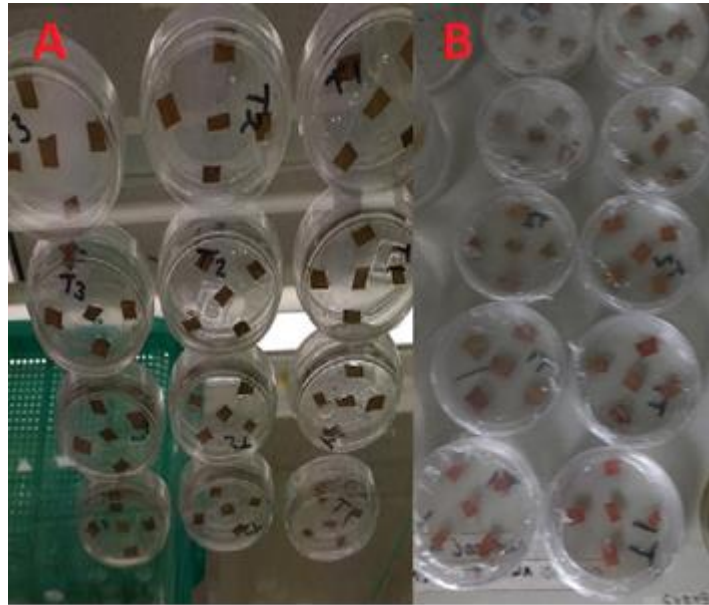


**Figura 21.** Obtencion de explantes.

Posteriormente los explantes fueron inoculados en medio nutritivo MS a  $\frac{1}{4}$  de sales suplementado con 2mg/L de 2,4 – D (Fig. 22), se sellaron y fueron llevados a la cámara bioclimática con una temperatura de 25°C  $\pm$ 1, con un fotoperiodo de 16hrs de luz y 8 de oscuridad (Fig. 23).



**Figura 22.** Explantes sembrados en medio de nutritivo MS.



**Figura 23.** Cajas en la cámara bioclimática A) Luz, B) Oscuridad.

Posteriormente los explantes asépticos después de 30 días fueron subcultivados en MS  $\frac{1}{4}$  de sales adicionado con 2 mg/L de 2,4-D.

Segundo experimento se realizó usando el protocolo de penicilina y cloruro de mercurio (P2), puesto que se selección por presentar menor contaminación en los explantes.

Se inocularon 4 explantes de  $mc^2$  por frasco (Fig. 24) con un total de 42 para separarlos a la mitad luz y oscuridad.



**Figura 24.** Explantes de pomarrosa cultivados en el P2.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN PARA SEMILLAS.

Las semillas de *Syzygium jambos* se inocularon en dos tratamientos, una semilla por frasco con medio MS, y el segundo tratamiento MS reducido a  $\frac{1}{4}$  de sales, ambos adicionados con 2 mg/L de GA<sub>3</sub>.

En la Tabla 1. Se muestran los resultados del protocolo de desinfección los datos fueron tomados cada 3 días, aproximadamente.

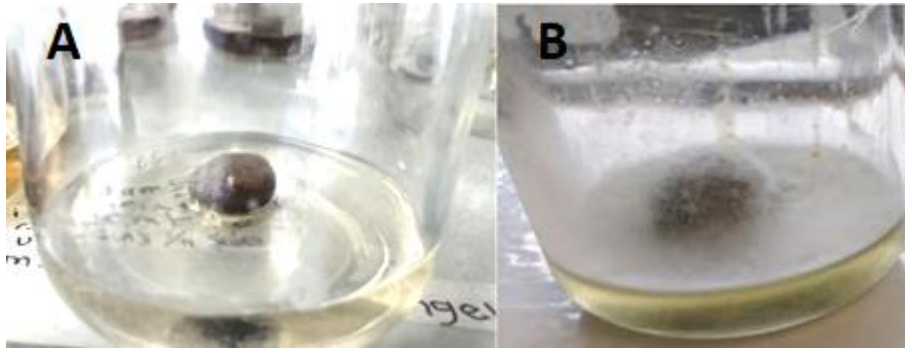
**Tabla 1.** Resultados del protocolo de desinfección de semillas

Revisión	Tratamiento MS + 2 mg/L GA <sub>3</sub>		Tratamiento MS $\frac{1}{4}$ de sales + 2 mg/L GA <sub>3</sub>	
	Fascos sin contaminación	Fascos contaminados	Fascos sin contaminación	Fascos contaminados
1	10	0	10	0
2	5	5	7	3
3	5	0	7	0

Para la germinación de semillas se tuvo un total de 20 frascos, obteniendo como resultado el 40% de contaminación (Gráfica 1). Además, se observa la comparación de un medio aséptico y un medio contaminado (Fig. 24). Finalmente, el 100 % de los cultivos se contaminaron por hongos.

**Gráfica 1.** Porcentaje total de contaminación.



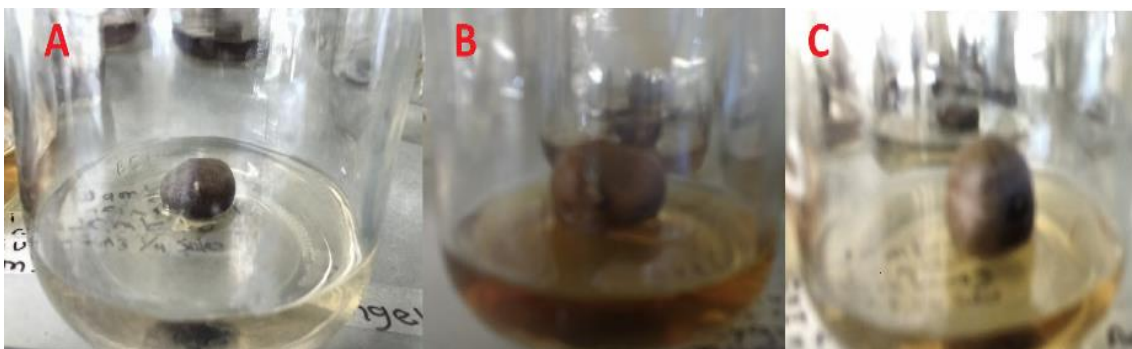


**Figura 25.** A) Libre de contaminación B) Contaminación por hongo.

La fenolización de los medios de cultivo se han comparado en la (Figura 20) donde A) fue tomada el primer día en que se inocularon las semillas, B) medio con sales totales y C) medio a  $\frac{1}{4}$  de sales se capturaron 7 días después. Al comparar A con B y C se puede notar claramente el oscurecimiento en los dos medios, en B el color marrón es más oscuro que en A.

Esto se debe al alto contenido de fenoles en las semillas, la a la oxidación del compuesto fenólico catalizado por la enzima polifenol oxidasa para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar generando daño celular e incluso la muerte (Terzi, 1990).

De esta manera se comprueba que el medio MS al reducirse a un cuarto de sales podría reducir la fenolización, posiblemente, a un 35% (Prashanta, 2003). Sin embargo, podría disminuir más si al medio de cultivo se le adicionan antioxidantes.



**Figura 26.** A) Medio sin fenolización B) Medio sales totales, C) Medio  $\frac{1}{4}$  de sales.

## 7.2 RESPUESTAS EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Las semillas usadas en este experimento fueron almacenadas después de la colecta por un periodo de 45 días a temperatura ambiente y la fenolización que produjeron en los medios de cultivo podrían ser las causas de que las semillas no tuvieran respuestas de germinación a pesar de tener 100 días cultivadas en el medio MS.

Puesto que las semillas frescas tienen un contenido de humedad del 50 % y no resisten ser secadas. La viabilidad de las semillas almacenadas sin sellar a temperatura ambiente es de menos de 1 mes. Sin embargo, un lote sin sellar almacenado a una temperatura de entre 2 y 4 °C retuvo una viabilidad del 50% por 3 meses (Wadsworth, 1943).

Por lo tanto se recomienda usar semillas recién colectadas y usar agentes antioxidantes para combatir la fenolización ya que esta podría provocar daño celular o incluso la muerte.

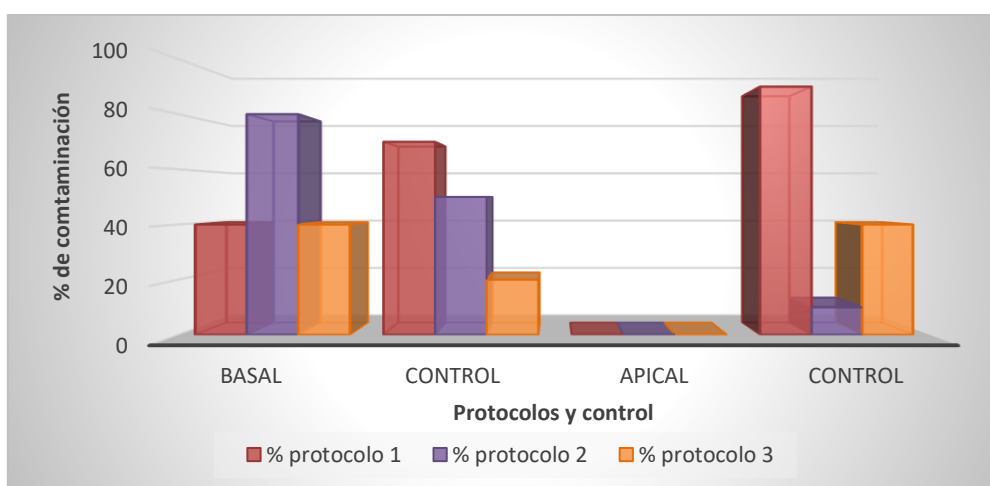
### 7.3 RESULTADOS DEL EXPERIMENTO 1

En este experimento se aplicaron los tres protocolos de desinfección en hojas adultas y jóvenes, más el control, en cada una. En la Tabla 2 se muestra el número de explantes contaminados después de 72 horas de haberse sembrado. Se colocaron 5 explantes por caja.

**Tabla 2.** Resultados de los protocolos de desinfección.

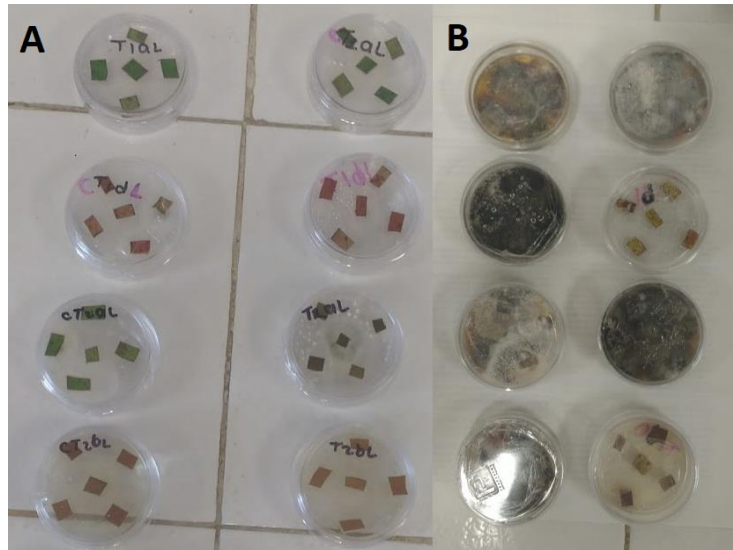
	Protocolo 1		Protocolo 2		Protocolo 3	
	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad
Basal	3	1	4	4	1	3
Control	5	2	1	5	1	1
Apical	0	0	0	0	0	0
Control	5	4	0	1	0	4

Como se puede observar en la tabla, los tres protocolos fueron eficientes para desinfectar hojas apicales puesto que 6 cajas inoculadas se encuentran en estado de asepsia y en los controles dos cajas se encuentran asépticas, a diferencia de las hojas basales donde las 6 cajas están contaminadas y así como también las 5 cajas control. Los porcentajes se ilustran en la Gráfica 2.



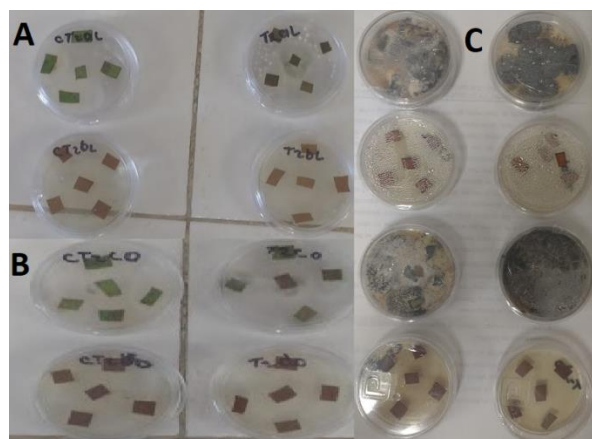
**Gráfica 2.** Porcentaje de contaminación en los protocolos.

Como se puede observar en la Gráfica el porcentaje de contaminación que se presenta que en las hojas basales llegan a 40% con el protocolo 1, 80% con el 2 y 40% con el 3 y el control tiene un promedio de contaminación del 50% en los tres. En las hojas apicales no se observó indicio contaminación en los tres protocolos y un promedio de contaminación de 50% en los controles. En las (figuras 26, 27 y 28) se observan las comparaciones de las cajas después de 7 días de haberse sembrado.

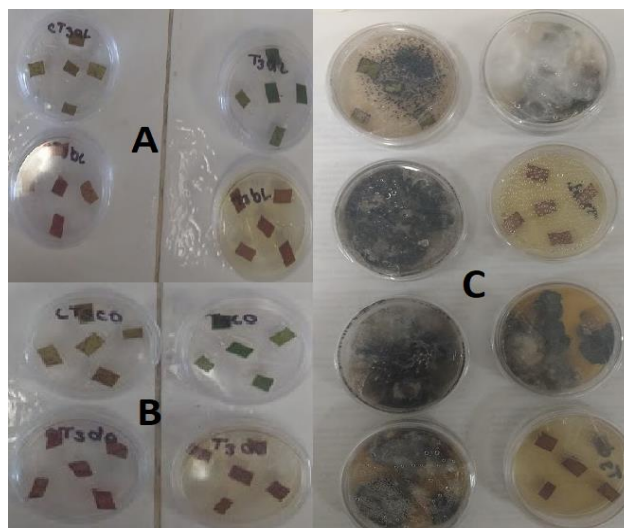


**Figura 27.** A) Tratamientos en luz sin contaminación B) Comparación entre el control y el protocolo 1.

A la izquierda se encuentran inoculados los explantes control, a la derecha están los que fueron desinfectados superficialmente con CAPTAN® y AGRIMYCIN®, se puede observar que los explantes apicales se encuentran libres de contaminación a diferencia de los basales.



**Figura 28.** A) Protocolo 2 y control en luz, B) Protocolo 2 y control en oscuridad C) Comparación del protocolo 2 y control,



**Figura 29.** A) Protocolo 3 y control en luz, B) Protocolo y Control en oscuridad C) Comparación del protocolo 3 y control.

En los diferentes experimentos que se realizaron se lograron obtener explantes asépticos pero estos no tuvieron respuestas morfológicas a pesar de que tienen aproximadamente de 45 días inoculadas en el medio. A pesar que el único reporte de inducción callos con plántulas asépticas de *S. jambos* dice que las respuestas se observaron 18 días después de la siembra en el medio de cultivo MS a un  $\frac{1}{4}$  de sales suplementado con 2mg/L de 2,4-D (Prashanta, 2003).

Posiblemente no se obtuvieron respuestas por la fenolización que presentaron los explantes, esto debió ser causado por la presencia de fenoles en el material vegetal los cuales posiblemente reaccionaron con los agentes desinfectantes que se usaron lo que pudo haber generado daño celular al explante e inclusive la muerte.

## 7.4 RESULTADOS DEL EXPERIMENTO 2

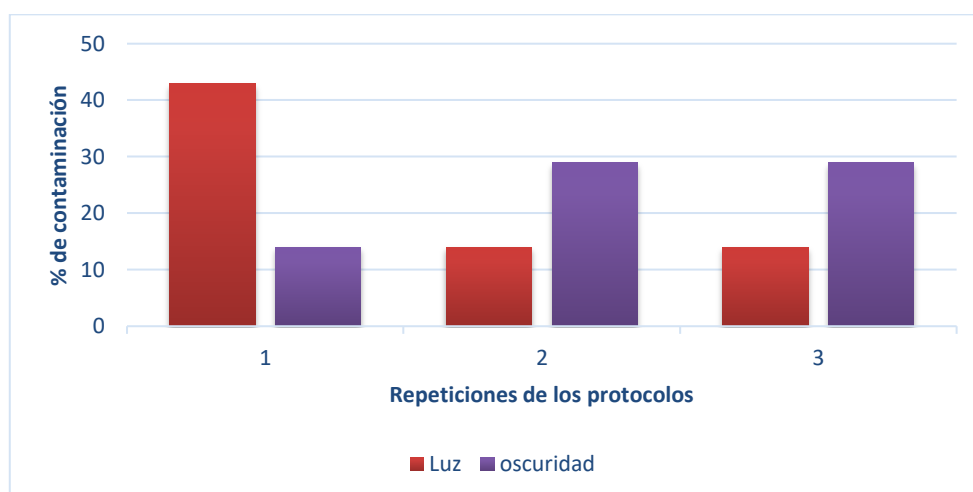
En este experimento se usó el protocolo dos para desinfectar las hojas se *S. jambos* y en la tabla 3 se encuentra reflejado el número de frascos contaminados por repetición se usaron 7 frasco y se inocularon 4 explantes por cada 1. Por lo tanto en la gráfica 3 se demuestra el porcentaje de contaminación de los frascos contaminados.

**Tabla 3.** Número de frascos contaminados del experimento.

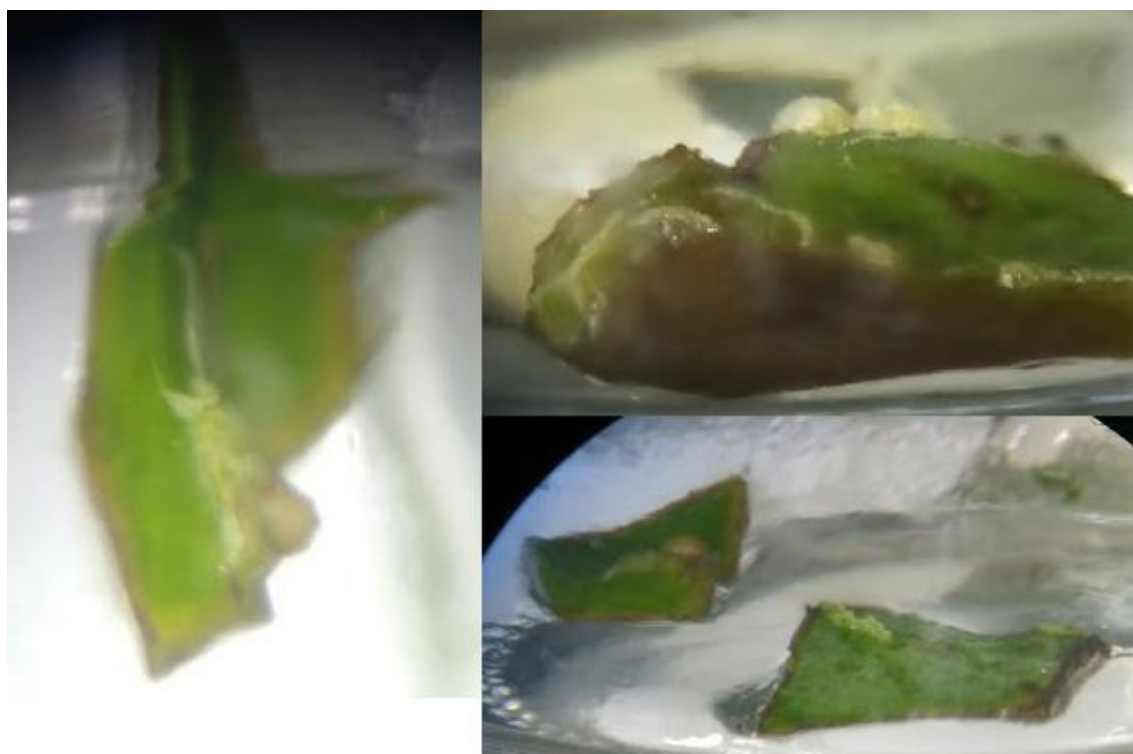
Protocolo 2		
No. De repetición	Luz	oscuridad
1	3	1
2	1	2
3	1	2



**Gráfica 3.** Porcentaje de contaminación en el experimento



Como se puede observar en este protocolo la contaminación fue menor del 50% en luz y oscuridad, al usar este protocolo se optimiza la desinfección de los explantes. Sin embargo se ha logrado obtener respuestas en la inducción de callos (Figura 30) aunque existen problemas de fenolización del medio.



**Figura 30.** Callos en explantes de hojas de *S. jambos* silvestre.

En las imágenes se puede observar la aparición de los callos en los explantes obtenidos de hojas silvestres de *S. jambos*, las respuestas fueron observadas 40 días después de la siembra, a diferencia lo reportado por Prashanta 2003, donde las respuestas comenzaron 18 días después. Esto podría deberse a que Prashanta uso plántulas asépticas, el tejido es más joven que el tejido de las hojas del árbol y a la desinfección con el protocolo donde fueron sometidas a químicos.

## 8. CONCLUSIONES

Las semillas no germinaron, posiblemente porque fueron almacenadas por un periodo mayor al que soportan.

Las hojas apicales, son idóneas para los tres protocolos de desinfección, sin embargo el protocolo de penicilina y cloruro de mercurio logro optimizar la desinfección.

El uso del regulador 2,4-D, promovió una respuesta positiva en la formación de callos.

## 9. PROBLEMAS A RESOLVER

- El hábitat natural de *Syzygium jambos* L. es principalmente en lugares con clima tropical – húmedo, y los árboles de pomarrosa tienden a crecer a la orilla de ríos. Debido a que las hojas silvestres contienen una gran carga microbiana y esporas de hongos como *Cercospora* sp., *Gloeosporium* sp., y *Phyllosticta eugeniae* entre otras. Esto representa un problema de contaminación al trabajar con estos explantes, por lo que se implementó un protocolo de desinfección para obtener explantes asépticos, con el fin de generar respuestas callogénicas.
- La oxidación fenólica se debe a la presencia de fenoles en los explantes los cuales son oxidados por la enzima polifenol oxidasa esto representa un serio problema para su supervivencia, la cual se manifiesta como el oscurecimiento del medio de cultivo, en este caso comienza por la zona cercana del explante y puede extenderse a todo el medio. Produciendo daño celular e incluso puede provocar la muerte. Este fenómeno es más agudo en especies leñosas.

## 10. ALCANCES Y LIMITACIONES

### ALCANCES

- Se logró comprobar que los explantes provenientes de hojas apicales son más fáciles de desinfectar con cualquiera de los tres protocolos.
- Se logró obtener callos con una concentración de 2mg/L de 2,4-D usando las hojas silvestres y el protocolo de desinfección con Cloruro de Mercurio.

### LIMITACIONES

- La principal limitación de este proyecto fue iniciar la inducción de callos usando plántulas asépticas, esto se debió al carecimiento de semillas ya que estos frutos son de temporada y la viabilidad es de un mes de almacenamiento.

## 11. COMPETENCIAS DESARROLLADAS

Realizar la residencia profesional en el Laboratorio de Cultivos Vegetales me ha ayudado a desarrollar una serie de competencias como estudiante y futura profesionalista, este ejercicio ha fortalecido mis conocimientos teóricos para aplicarlos en la práctica.

Durante mi estancia aprendí a usar aparatos de uso exclusivo del laboratorio, así como a realizar siembras en medios de cultivo de manera aséptica, entre otras cosas.

Una parte importante de esta experiencia fue el hecho de investigar de manera correcta información científica que me ayudó a llevar a cabo el proyecto de investigación.

Como persona desarrolle un sentido de trabajo en equipo, ser paciente para obtener los resultados y humilde con los compañeros.

## 12. RECOMENDACIONES

- Al desarrollar este proyecto se observó que las semillas de *S. jambos* tienen un tiempo de viabilidad limitado por lo que se recomienda para germinar *in vitro* el uso de semillas frescas.
- Para reducir la fenolización producida por las semillas y las hojas se recomiendan añadir agentes antioxidantes al medio.
- Al usar hojas jóvenes en los protocolos de desinfección se lograron tener explantes asépticos. Por esta razón se recomienda que se usen hojas apicales para la optimización de los protocolos.
- Se recomienda mantener los explantes en el medio MS a  $\frac{1}{4}$  de sales, adicionado con 2,4-D por un periodo de 40 para observar las respuestas calogénicas.

### 13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamson, W. G. 1989. Plant-animal interactions. Ed. McGraw-Hill. USA.
- Avalos G. A. y Perez U., H. 2009. Metabolismo secundario de Plantas. [Libro] Madrid, pp.122-140. Disponible en: [http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo\\_secundario\\_de\\_plantas.pdf](http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf)
- Barakat, T., Jackson A. H., Abdullah M. I. 1977. Further studies of *Erythrina* alkaloids. *Lloydia* 40: 471.
- Crane E., Walker P. 1984. Pollination directory for world crops. International Bee Research Association, London, UK.
- Dummel G, Chemli R, Balansard G, Guirand H, Lallemand M. 1980. Evaluation and other homeopathic tinctures of *C. officinalis* and *C. arvense*. *Ann Pharm Fr.* 38 (6):493-499.
- Esquivel R., Eduardo A. 2008. Reporte preliminar de la Roya de las Mirtáceas, *Puccinia psidii* Wint. (Pucciniaceae, Uredinales), sobre *Syzygium jambos* en Panamá.
- Félix B. J., Cruz B., Sáenz Z. M. 2002. Determinación de la bioactividad de extractos de 25 especies vegetales mediante la interacción con ADN por cromatografía líquida de alta resolución. San Salvador, el Salvador: p.41.
- Francis J.K. 1990. *Syzygium jambos* L. Alston. SO-ITF-SM-26. Rio Piedras, Institute of Tropical Forestry.
- Goodwin, T. W., Mercer, E. I. 1983. Introduction to Plant Biochemistry. Second Edition Pergamon Press. U.K.
- Hossain H., Rahman S., Akbar P., Khan T., Rahman, M. and Jahan, I. 2016. HPLC profiling, antioxidant and in vivo anti-inflammatory activity of the ethanol extract of *Syzygium jambos* available in Bangladesh. *BMC Research*.
- Maldonado R. 1985. Los productos en las plantas. Vol. I. Centro de Investigación en Química Aplicada. Coahuila. México.
- Momokolkeuchi, Keiko S., and A. 2013. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. Review
- Morales L. y Varón T. 2006. Árboles Ornamentales en el Valle de Aburrá, Elementos de Manejo.
- Murashige T. & Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*.
- Nagata T., and Takebe I. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99:12–20.
- Petiard, V.; Bariaud F. A. 1987. El cultivo de células. Mundo Científico.

Piñol, M. T.; Palazón, J. 1993. Metabolismo secundario. En: Fisiología y Bioquímica Vegetal. Azcon-Bieto, J.; Talón, M. (eds) Editorial Interamericana McGraw Hill. España.

Prashanta, K., Sathyanarayana, B. and mathew, D. 2003. *In vitro* callus induction and plantlet regeneration in Roseapple (*Syzygium jambos* L.). *Society for plant physiology and biochemistry*.

Sharma, R., Kishore, N., Hussein, A. and Lall. N. 2013. Antibacterial and anti-inflammatory effects of *Syzygium jambos* L. (Alston) and isolated compounds on acne vulgaris. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.

Slater, N. Scott, M. Fowler. 2008. Plantbiotechnology. Oxford University Press. USA.

Soto Pinto, M. L., 2000. Manejo de especies arbóreas para sistemas agroforestales en la región maya tzotzil-tzeltal del norte de Chiapas. El Colegio de la Frontera Sur. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. M018. México D. F.

Steward, F.C., Mapes, M.O., and Mears, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J.*

Streets RJ. 1962. Exotic forest trees in the British Commonwealth. Clarendon Press, Oxford.

Taiz, L.; Zeiger, E. 1998. Surface protection and secondary defense compounds. En: *Plant Physiology*. 2<sup>nd</sup> Ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers. USA.

Terzi, M. and Lo Schiavo, F. 1990. Somatic embryogenesis. In: Bhojwani, S.S. (ed). *Plant tissue culture: applications and limitations*. The Netherlands: Elsevier.

Troup RS. 1975. *The silviculture of Indian trees*. ed. 2, vol. 1. Government of India.

Vanisree M, Lee CY, Lo S-F, Nalawade SM, Lin CY, Tsay H-S, 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin. Review*.

Vanisree M, Tsay H. S. 2004. Plant cell cultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*.

Verpoorte, R. 2000. Secondary Metabolism. En: *Metabolic engineering of plants secondary metabolism*. Verpoorte, R.; Alfermann, A.W. (eds). Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

W.M. Morgan. 2009. Cultivo de tejido vegetal. International Plant Laboratories. UK.A.

Wadsworth, Frank H. 1943. Pomarrosa, *Jambosa jambos* (L.) Millsp. and its place in Puerto Rico. *Caribbean Forester*.



## REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

<http://www.articulos.infojardin.com/Frutales/fichas/pomarrosas-jambolero-pomarroso-syzigium-jambos.htm>

<http://www.elmundo.com/portal/pagina.general.impresion.php?idx=264432>

<http://www.flores.ninja/la-pomarrosa/>

<http://www.geovidasoc.blogspot.mx/2015/02/pomarrosa-fruto-que-se-pierde.html>

<http://www.mexico.pueblosamerica.com/chiapas/las-margaritas/>

<http://www.microrregiones.gob.mx>

<http://www.plantasdemexico.blogspot.mx/2011/10/pomarrosa-syzygium-jambos.html>

<http://www.sabelotodo.org/agricultura/frutales/pomarrosa.html>